

**Lymphozytenseparation aus abgestossenen
allogenen Nierentransplanten und
Charakterisierung dieser Zellen**

Ingo Senfleber

Düss
München
1984

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel)
der Universität München

LYMPHOZYTENSEPARATION AUS ABGESTOSSENEN
ALLOGENEN NIERENTRANSPLANTATEN UND
CHARAKTERISIERUNG DIESER ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ingo Senftleber

aus
Überlingen

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0036

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Brendel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. C. Hammer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.1984

1. Einleitung

2. Zielsetzung und Begründung

3. Methodik

4. Ergebnisse und Diskussion

5. Zusammenfassung und Ausblick

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

8. Glossar

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

A	EINLEITUNG	1
B	METHODEN UND MATERIAL	11
	1. Versuchstiere	11
	2. Operationsvorbereitung und Anästhesie	11
	3. Präparation und Transplantation der Niere	11
	4. Postoperative Pflege der Tiere	13
	5. Explantation der Niere	14
	6. Bestimmungsmethoden	15
	a) Messungen	15
	I. Harnstoff und Kreatinin im Serum	15
	II. Serum-Natrium und -Kalium	15
	III. Nierengewicht vor Transplantation und nach Explantation	15
	b) Hämatologische Untersuchungen	15
	I. Leukozytenzahl	15
	II. Thrombozytenzahl	16
	III. Blutausstrich	16
	IV. Hämatokrit	16
	c) Histologische Untersuchungen	16
	d) Immunologische Untersuchungen	16
	Vorbemerkungen	16
	I. Mitogenstimulationsteste	19
	II. Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)	20
	III. Suppressor-Helferzell-Assay	21
	IV. Immunfluoreszenzmikroskopie	22
	7. Separation der in die abgestoßenen Nieren einge- wanderten Zellen	22
	a) Vorbereitung der Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule	23
	b) Herstellung eines Nierenhomogenisates	25
	c) Filtration der Nierensuspension durch ein Mikro- filtrationsgerät	27

d) Lymphozytenanreicherung mittels Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule	29
e) Untersuchung der gewonnenen Zellen	30
I. Charakterisierung	30
II. Vitalität	30
8. Statistische Auswertung	31
C ERGEBNISSE	32
1. Allgemeines und Vorversuche	32
2. Ergebnisse der Messungen	38
I. Harnstoff und Kreatinin im Serum	38
II. Serum-Natrium	39
III. Serum-Kalium	40
IV. Nierengewicht vor Transplantation und nach Explantation	40
3. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen	41
I. Leukozyten- und Thrombozytenzahl	41
II. Blutausstrich	42
III. Hämatokrit	42
4. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	43
5. Ergebnisse der Lymphozytenseparation aus abge- stoßenen Nieren	44
6. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen	47
I. Mitogenstimulationsteste	47
II. Gemischte Lymphozytenkultur	48
III. Suppressor-Helferzell-Assay	49
IV. Immunfluoreszenzmikroskopie	50
7. Ergebnisse der Lymphozytenseparation aus einer humanen Transplantatniere	50
I. Klinisch relevante Daten	50
II. Zellausbeute	51
III. Immunologische Untersuchung der Lymphozyten in verschiedenen Testsystemen	52

a) Mitogenstimulationsteste	52
b) Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)	53
c) Suppressor-Helferzell-Assay	54
d) Immunfluoreszenzmikroskopie	55
e) Lymphozytotoxischer Test	55
D DISKUSSION	56
1. Diskussion der Methodik	56
I. Kriterien zur Beurteilung der Abstoßung allogener Nierentransplantate	56
II. Die "Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule" im Ver- gleich zu anderen Methoden der Lymphozyten- separation	58
III. Besprechung der immunologischen Methoden	69
a) Immunfluoreszenzmikroskopie	69
b) Mitogenstimulationsteste	69
c) Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)	72
d) Suppressor-Helferzell-Assay	74
2. Diskussion der Ergebnisse	76
I. Charakterisierung der Zellinfiltration während der allogenen Transplantatabstoßung	76
II. Funktion der separierten Lymphozyten	79
E ZUSAMMENFASSUNG	86
F LITERATURVERZEICHNIS	87

A EINLEITUNG

"Die Wiederherstellung und Verbesserung verstümmelter Theile des Körpers sind von solcher Bedeutsamkeit, sowohl für den Verstümmelten selbst, als auch für die menschliche Gesellschaft überhaupt.

Die Beispiele von wahrhaft glänzenden Heilungen sind aber im Ganzen noch sehr selten.

Vielmehr muß diese Mangelhaftigkeit des Kunsttalentes, sowie die Schwierigkeit des Unternehmens selbst, jedem Wundarzte ein Sporn sein, es im Formen am Lebendigen weiter zu bringen".

(J. F. Dieffenbach, 1829) (61).

Heute - 150 Jahre später - ist das "Kunsttalent" moderner Ärzte weitaus weniger mangelhaft und auch "im Formen am Lebendigen - der Transplantation - hat die moderne Chirurgie große Fortschritte gemacht.

Sprunghaft verlief diese Entwicklung allerdings erst seit Beginn unseres Jahrhunderts. So konnten nach der Einführung der Gefäßnaht 1902 durch Carrel (38) erste tierexperimentelle allogene Nierentransplantationen wenigstens chirurgisch erfolgreich durchgeführt werden - wenngleich die allogenen Transplantate alle bald abgestoßen wurden (56, 253). Nachdem dieses chirurgische Problem gelöst war, ließ sich die Entwicklung der Transplantationsimmunologie nicht mehr stoppen und verlief in rascher Folge.

So unterschied Lexer 1911 erstmals die Transplantation in körpereigen (autolog) und körperfremd (homolog, allogene). 1912 führte Schöne (232) den Begriff der "Transplantationsimmunologie" ein und wollte damit zeigen, daß es sich bei der Allogentransplantatabstoßung um das Ergebnis einer Immunantwort handelt. Er hielt die allogene Transplantation von Organen für aussichtslos und sah nur in der autologen Transplantation eine Chance auf Erfolg. Murphy (176) war es, der 1914 erstmals ent-

deckte, daß die Mechanismen, die für die Transplantatabstoßung verantwortlich sind, mit lymphoidem Gewebe - am wahrscheinlichsten dem kleinen Lymphozyt - assoziiert sind. 1944 - 1947 gelang es der Gruppe um Medawar (162, 163) durch ihre klassischen methodischen Experimente, darzustellen, daß die Phänomene der Transplantatabstoßung immunologischer Natur sind. Damit schuf er die Basis für die moderne Transplantationsforschung, als deren große Erfolge die Einführung der medikamentösen Immuntherapie mittels Corticosteroiden (273), Zytostatika (233) und Antilymphozytenglobulin (ALG) (28, 29, 30, 174, 235) zu nennen sind.

Heute ist die Nierentransplantation beim Menschen zu einer anerkannten und häufig durchgeführten Behandlungsmethode geworden - allein in Deutschland wurden 1982 922 Nieren transplantiert (142). In den USA sind es sogar über 4 000 (117) gewesen.

Diese hohe Transplantationsfrequenz ist um so mehr als Erfolg zu werten, als die durchschnittliche 5 Jahres-Überlebenszeit der allogenen Nieren über 50 % betrug (234, 243).

Diese Transplantationsüberlebenszeit allogener Nieren hat sich trotz intensiver Forschungsarbeit in den letzten 10 Jahren nicht wesentlich verbessert.

In neuester Zeit jedoch wurde ein richtungsweisender Durchbruch in der Therapie der Abstoßungskrise mittels Immunsuppressiva erreicht:

Durch das 1972 von Borel (26) entdeckte Cyclosporin A wird über Transplantatüberlebenszeiten allogener Nieren von 70 - 88 % nach einer Beobachtungsperiode von ca. 1 Jahr berichtet (34, 71, 75, 145, 179). Noch eindrucksvoller sind die Ergebnisse bei der Lebertransplantation - hier betrugen die 1 Jahres-Überlebenszeiten unter Verwendung herkömmlicher Immunsuppressiva 30 - 40 %, mit Cyclosporin A stieg sie auf ca. 70 % an (35, 194, 236).

Auch bei Herztransplantationen wird über verbesserte Ergebnisse berichtet (93, 244).

Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A noch nicht völlig geklärt ist, so ist doch sicher, daß diese Substanz nicht auf jede sich teilende Zelle (wie Zytostatika) oder nur auf Lymphozyten (wie ALG, Steroide) zytotoxisch wirkt, sie greift ganz gezielt in die zellulären Interaktionen zwischen Lymphozyten-Subpopulationen ein.

Wir haben hier also den Prototyp der 3. Generation von Immunsuppressiva vor uns, der durch selektive Immunregulation, d. h. Beeinflussung von Subpopulationen immunkompetenter Zellen, gekennzeichnet ist.

Anhand dieses Beispielen wird deutlich, welche enge Korrelation zwischen der Entwicklung neuer Therapieprinzipien und dem Fortschritt immunologischer Grundlagenforschung besteht. Denn ohne ein besseres Verständnis der Transplantatreaktion in den letzten 10 Jahren wäre es wahrscheinlich noch nicht zur klinischen Einführung dieser Substanz gekommen.

Wie sieht nun gegenwärtig das Konzept der Transplantatabstoßung aus ?

Prinzipiell lassen sich vier Formen von Abstoßungsreaktionen unterscheiden:

1. Hyperakute Abstoßung, die innerhalb von Minuten bis Stunden zustande kommt und der präformierte zirkulierende Antikörper zugrunde liegen.
2. Akzelerierte Abstoßung, die nach wenigen Tagen auftritt, wobei die Menge an zirkulierenden Antikörpern offenbar geringer als bei der eben genannten hyperakuten Form ist.
3. Akute Abstoßung, die sich in ihrer Frühform nach weniger als zwei Wochen, in ihrer Spätform nach mehr als zwei Wochen entwickelt.
4. Chronische Abstoßung, deren Manifestierung Wochen bis Jahre dauert (66, 178).

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf den Mechanismus der akuten Abstoßungsreaktion eingegangen werden, der sich vereinfacht in drei Phasen unterteilen läßt, die jedoch streckenweise parallel ablaufen.

1. Die Stimulation des Immunsystems durch das Transplantat (= afferenter Schenkel der Immunantwort).
2. Die Reaktion des zentralen lymphatischen Systems (= efferechter Schenkel der Immunantwort).
3. Die Zerstörung des Transplantates.

ad 1: Die Stimulation des Immunsystems setzt die Expression von Antigenen des sogenannten "Major histocompatibility Complex" (MHC) auf der Oberfläche von Zellen des Transplantates voraus. Der MHC besteht zumindest aus 2 Antigenarten:

1. Klasse: den HLA -A,B,C (HLA = Human leucocyte antigen) und
2. Klasse: den HLA -D / DR (60, 64, 248, 268).

Diese Antigene sind bei menschlichen Nieren auf den Endothelzellen stark, auf den Parenchymzellen hingegen schwach ausgeprägt (102). Auf den sogenannten "Passenger-Leukozyten", das sind Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Transplantation in der Niere befinden (16, 96, 238, 239), sind Transplantationsantigene der HLA - ABC und -DR-Klasse ebenfalls in großer Dichte vorhanden.

Es kommen also in erster Linie Endothelzellen (94) und Passenger-Leukozyten, die auch eigene Migration zeigen können, als Immunogen in Betracht, wobei nicht endgültig geklärt ist, welche Zelle stärker sensibilisierend wirkt. Einige Autoren allerdings geben den Passenger-Zellen den Vorzug (17, 97, 245).

Sobald die Niere transplantiert ist und die Blutperfusion einsetzt, beginnt die Phase der Stimulation des Empfängerorganismus. Hierbei haben viele Lymphozyten Gelegenheit, in Kontakt mit immunogenen Endothel- und Passengerzellen zu treten (13, 164, 171, 214, 229). Kommt ein Antigen-reaktiver T-

Lymphozyt (= "Inducer-Lymphozyt") des Empfängers unter Mithilfe von Makrophagen (19, 206, 213, 224) und Interleukin 1 (Il-1), einem Antigen-unspezifischen Produkt von Makrophagen, das die Aktivierung von Helfer-T-Lymphozyten fördert (187, 212), mit dem Transplantationsantigen, für das er einen Rezeptor auf seiner Oberfläche trägt, in Berührung, so fängt dieser Zellklon an, sich zu teilen (37).

Ein Teil dieser aktivierten Helfer-T-Lymphozyten verbleibt im Transplantat und leitet eine Reaktion in situ ein (periphere Sensibilisierung) (8). Einige andere sensibilisierte Lymphozyten rezirkulieren in zentrale lymphoide Organe wie Lymphknoten und Milz, proliferieren dort (39) und helfen kleinen Lymphozyten, sich entweder zu Antikörper-produzierenden Zellen zu entwickeln (humorale Immunität) oder aber als zytotoxische Zellen (zelluläre Immunität) in das Transplantat zu wandern (zentrale Sensibilisierung) (39, 178, 214, 241).

In welchem Ausmaß periphere und zentrale Sensibilisierung des Empfängers an der Initiierung der Abstoßungsreaktion beteiligt sind, ist noch strittig (6, 101, 190, 229).

ad 2 und 3: Nachdem die Sensibilisierung eingeleitet ist, beginnt parallel dazu schon die Phase zwei, die ihrerseits fließend in die Phase drei der Abstoßungsreaktion - die Zerstörung des Transplantates - übergeht.

Die Abstoßung eines allogenen Organtransplantates ist die komplexe Form einer Immunantwort, an der sowohl Komponenten der zellulären, als auch der humoralen Immunität teilhaben.

1. Zelluläre Immunität:

An der zellulären Immunität sind außer den zytotoxischen T-Lymphozyten folgende Zellpopulationen beteiligt:

T-Lymphozyten (thymusabhängige Lymphozyten) in Gestalt von T-"Inducer"- bzw. Helfer-Zellen und Suppressor-/Killer-Zellen und Makrophagen (7, 10, 149). Über die Rolle der Granulozyten bei der Abstoßungsreaktion herrscht Unklarheit (149).

Durch die Interaktion von spezifisch sensibilisierten Lymphozyten und dem Antigen im Transplantat werden ein oder mehrere noch nicht näher definierte Lymphokine (109), die jedoch nicht mit Interleukin-1 oder -2 identisch sind, frei. Die Sekretion dieser Lymphokine bewirkt eine Verstärkung der regionalen Durchblutung und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (108, 121). In der Folge tritt eine Rekrutierung sowohl sensibilisierter, als auch nicht-sensibilisierter Lymphozyten und anderer Zellpopulationen auf. Daß sich trotz dieser unspezifischen Rekrutierung spezifisch sensibilisierte Lymphozyten im Organ anreichern, ist damit zu erklären, daß die spezifischen Zellen in größerer Anzahl in der Zirkulation vorkommen (188). Dadurch tritt also auch durch unspezifisches Rekrutment eine Anreicherung der spezifischen Lymphozyten im Transplantat auf, die ihrer Konzentration im Blut direkt proportional ist (199, 252). Außerdem ist bekannt, daß spezifisch sensibilisierte Lymphozyten im Transplantat reifen und sich teilen können, so daß auch durch unspezifische Rekrutierung einiger weniger sensibilisierter Lymphozyten die wichtige Verstärkung der Abstoßungsreaktion die Folge ist (6).

Dank der Entwicklung monoklonaler Antikörper (116), die gegen die Oberflächen-Antigene humaner Lymphozyten gerichtet sind, ist man heute auch beim Menschen in der Lage, funktionelle Lymphozytensubpopulationen entsprechend ihrem Oberflächen-Phänotyp zu unterscheiden.

Man unterscheidet unter anderem Lymphozyten mit dem Phänotyp T 4 (= Inducer / Helfer) und T 8 (= Suppressor / zytotoxisch), während man unter T 3 Zellen die Gesamtheit aller T-Lymphozyten (pan-T-Lymphozyten) versteht. Gelegentlich werden diese Zellpopulationen entsprechend ihrem Bindungsvermögen für die entsprechenden monoklonalen Antikörper auch als OKT 3-, OKT 4- und OKT 8-positive Zellen bezeichnet.

Die sensibilisierten Lymphozyten werden durch Interaktion zwischen zwei T-Zellpopulationen (T-Helfer und -"Precursor"-Zellen) zytotoxisch. Als Helferzellen treten dabei die OKT 4-

positiven Lymphozyten in Erscheinung - kurzlebige Zellen, die hauptsächlich auf LD-Alloantigene (LD = lymphocyte derived) reagieren. Bei der zytotoxischen Effektorzelle handelt es sich um OKT 8-positive Lymphozyten, die im Gegensatz zu den T 4-Zellen langlebig sind und auf allo-gene SD-Antigene (SD = serum derived) ansprechen (89, 149, 152, 211, 256).

Die OKT 4-positiven Helferzellen unterhalten durch Sekretion von Interleukin 2 (Il-2), das sich an Il-2 Rezeptoren der zytotoxischen OKT 8-positiven Zellen bindet, die Proliferation dieser Lymphozyten (146, 228, 257). Im Verlauf der Abstoßungsreaktion steigt die Zahl der OKT 8-positiven Zellen verglichen mit den OKT 4-positiven wesentlich stärker an, was auf die Bedeutung der T 8-Zellen als zytotoxische Effektorzellen hinweist (105).

Die Zelllysis im Transplantat erfolgt durch Zell-zu-Zell-Kontakt (13), wobei die T 8-Zellen Lymphotoxin entlassen, das dann zur Lysis der Plasmamembran der Targetzellen führt (155).

Durch die unspezifische Rekrutierung von Zellen gelangen auch nicht-sensibilisierte Lymphozyten und Makrophagen ins Transplantat.

Ein Teil dieser nicht-spezifischen Lymphozyten (K-Zellen = Killer-Lymphozyten) ist in der Lage, durch Koppelung spezifischer humoraler Antikörper an ihre Zelloberfläche spezifische Zytotoxizität auszulösen (ADCC = Antibody dependent cellular cytotoxicity). Davon zu unterscheiden ist die zytotoxische Aktivität von sogenannten NK (natural killer)-Lymphozyten, die als spontane Lymphozytotoxizität (SCMS) bezeichnet wird. Sie ist Antikörper-unabhängig. In wie weit sie spezifisch ist, ist noch strittig (210).

Die Makrophagen werden durch MIF (Migration inhibiting factor), einem Produkt sensibilisierter Lymphozyten, am Ort der Abstoßung gehalten (13, 39, 80). Mittels des spezifischen MAF

(Macrophage arming factor) - ebenfalls von T-Lymphozyten gebildet - werden die Makrophagen aktiviert (72, 149) und üben eine unspezifische Zytotoxizität gegenüber dem transplantierten Gewebe aus, indem sie eine Reihe von Enzymen ausscheiden, die auf Zellen des Transplantates zytotoxisch wirken (55, 90, 155).

Außer den Zellen, die im positiven Sinne an der Abstoßungsreaktion beteiligt sind, sind auch die Suppressor-T-Lymphozyten zu berücksichtigen: Sie können in der MLC (mixed lymphocyte culture) die Bildung zytotoxischer Effektorzellen unterdrücken.

Die exakte Bedeutung der Suppressorzellen im Transplantat entzieht sich noch der genauen Kenntnis (7, 15, 118, 155).

2. Humorale Immunität:

Das zentrale Ereignis im Rahmen der humoralen Immunität besteht in der Bildung von Antikörpern durch Plasmazellen. B-Lymphozyten (Bursaäquivalent-abhängige Lymphozyten) werden durch Antigenkontakt mittels Makrophagen aktiviert (213) und kommunizieren mit ebenfalls durch Antigen aktivierten T-Helferzellen durch einen T-Zell-ersetzenden Faktor (TRF). Dadurch kommt es zur Differenzierung des B-Lymphozyten zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle (259).

Dabei müssen T-Helferzellen und B-Lymphozyten identisch in der Ia-Region des MHC sein (127). Der geschilderte Vorgang findet wahrscheinlich sowohl im Transplantat, als auch in den Lymphknoten statt (178).

Nach Bindung an das korrespondierende Antigen kann durch den Antigen-Antikörper-Komplex Komplement aktiviert werden. Hierdurch kommt es zur Anziehung polymorphkerniger Leukozyten und neutrophiler Granulozyten und zur Thrombozytenaggregation. Die Permeabilität der Gefäße wird gesteigert, die glatten Muskelzellen kontrahieren sich und aus den Mastzellen wird Histamin freigesetzt. Wahrscheinlich aufgrund von

Schädigung der Epithelien durch Antikörper und Komplement kommt es in den Gefäßen des Transplantates zu Fibrinablagerungen (13, 124, 149, 214). Antigen-Antikörper-Komplexe und Antikörper wurden im Endothel von Blutgefäßen des transplantierten Organs und in den Glomerula gefunden (13, 161, 178).

Einige Autoren sehen im Vorkommen von Antikörpern nicht nur ein die Abstoßung begünstigendes Ereignis. Besonders den Anti-B-Lymphozyten-Antikörpern werden protektive Eigenschaften zugeschrieben (125).

Im Gegensatz dazu steht die Meinung von V. Lepage (150) und R.B. Ettenger (70), die den Anti-B-Lymphozyten-Antikörpern keine schützenden Fähigkeiten zubilligen.

G. Luciani (157) konnte weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die Abstoßung registrieren. T. Mohanakumar (173) berichtete, daß es sich bei den Anti-B-Lymphozyten-Antikörpern um IgG und IgM, bei den Antikörpern gegen Nierenzellen um IgG, IgM und IgA handelt.

Ebenso wie bei der zellulären Immunität spielen außer den Helferzellen die Suppressorzellen eine Rolle. Antigenspezifische und -unspezifische Supressorfaktoren, die von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen gebildet werden, hemmen die T-Helferzellen (259).

Y.Thomas (247) stellte 1980 fest, daß die Suppression, die mittels OKT 8-positiven Zellen induziert wird, die Anwesenheit von OKT 4-positiven Zellen als Helferzellen erfordert. Eine weitere Möglichkeit, die Antikörperproduktion zu verhindern, beschreibt E. Wecker (259):

Antigen-Antikörper-Komplexe besetzen TRF-Rezeptorstellen auf den B-Lymphozyten und verhindern somit die Kooperation zwischen B- und T-Zellen.

Wie aus diesen Ausführungen ersichtlich wird, haben wir heute schon ein sehr tiefgreifendes Verständnis der Abstoßungsmechanismen.

Daß Transplantate immer noch zu einem hohen Prozentsatz abgestoßen werden, liegt zum einen daran, daß dieses Wissen noch nicht vollständig ist, zum anderen aber auch sicher daran, daß fast alle diese Erkenntnisse aus in vivo oder in vitro Untersuchungen an peripheren Zellen, insbesondere Lymphozyten gewonnen wurden.

Es gibt nur sehr spärliche Informationen über das Verhältnis von Lymphozyten-Subpopulationen und ihre Interaktionen innerhalb des in Abstoßung befindlichen Organs.

So war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, am Hundemodell eine Methode der Lymphozytenseparation aus allogenen Transplantatnieren zu entwickeln und die Art und Funktion der Infiltratlymphozyten zu charakterisieren.

B METHODEN UND MATERIAL

1. Versuchstiere:

Als Nierenspender dienten Bastardhunde mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $18 \pm 2,7$ kg, während die Empfänger-tiere ein Gewicht von $16 \pm 1,3$ kg hatten ($n = 32$).

Aus operationstechnischen Gründen wurden als Empfänger bevorzugt weibliche Tiere verwendet.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 14 Tage lang in Quarantäne gehalten, nachdem sie vorher aktiv gegen Staupe, Leptospirose und Hepatitis* geimpft worden waren und von Ekto- und Endoparasiten befreit** worden waren.

Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum.

2. Operationsvorbereitung und Anästhesie:

24 Stunden präoperativ wurde den Tieren das Futter entzogen. Die Hunde wurden mit 25 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium*** intravenös narkotisiert und anschließend endotracheal intubiert.

Sie atmeten spontan. Die Herzfunktion wurde mittels EKG-Ableitung kontinuierlich überwacht.

Intraoperativ erhielten sowohl Spender, als auch Empfänger 250 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung **** als Volumeninfusion.

3. Präparation und Transplantation der Niere

Unter sterilen Kautelen wurde dem Spender mittels eines Median-schnittes die Bauchhöhle eröffnet und eine Niere mit ihren Gefäßen bis zur Aorta abdominalis bzw. Vena cava in-

* Candur-SHL, Behringwerke, Marburg

** Alugan, Hoechst AG, Frankfurt/M.

*** Nembutal, Deutsche Abbott GmbH, Ingelheim

**** 0,9 % NaCl, Boehringer-Mannheim, Mannheim

ferior präpariert und mobilisiert. Nach Darstellung und Mobilisation des Ureters wurde dieser 3 Zentimeter proximal des Ostium ureteris abgesetzt und die Niere nach Ligatur und Durchtrennung von Arteria- und Vena renalis nahe ihres Abganges aus den großen Gefäßen exstirpiert.

Die Niere wurde sofort extrakorporal mit 500 ml einer Elektrolytlösung*, die 5000 Einheiten Heparin-Natrium** enthielt und auf 4° C abgekühlt war, perfundiert.

Nach der Perfusion wurde das Transplantat gewogen und bis zu Beginn der Implantation in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung mit einer Temperatur von 4° C gelagert.

Auf einem zweiten Operationstisch wurde zeitlich parallel mit dem Beginn der Nierenperfusion der Empfängerhund in der beschriebenen Weise auf die Transplantation vorbereitet.

Nach Abschluß der Perfusion wurde die Peritonealhöhle des Empfängers mittels einer medianen Laparatomie eröffnet und die Arteria- und Vena iliaca externa einer Seite freipräpariert und die Arterie mobilisiert.

Die Vena renalis des Transplantates wurde End-zu-Seit in die Vena iliaca externa implantiert, die Arteria renalis, nach distaler Ligatur und proximaler Abklemmung mittels einer Cloverklemme, mit der Arteria iliaca externa des Empfängers anastomosiert.

Die Gefäßnaht erfolgte fortlaufend mit einem Faden der Stärke 6-0***. Während der Anastomosierung wurde die Niere mittels Kühlkissen und Beträufelung mit kalter physiologischer Kochsalzlösung auf 4° C gehalten.

Nach einer Gesamt-Ischämie-Zeit von durchschnittlich 60 Minuten wurde die Niere wieder durchblutet.

Kam es bei der Freigabe der Anastomosen für den Blutstrom gelegentlich zu kleineren Blutungen, so wurden diese mittels eines resorbierbaren Gelatineschwammes****, der jedoch stets

* Tutofusin, Pfrimmer & Co. Pharmazeutische Werke GmbH, Erlangen

** Thrombophob ad inj., Nordmark-Werke GmbH Hamburg, Werk Uetersen

*** Prolene 6-0, Ethicon GmbH, Norderstedt

**** Gelitta, B. Braun, Melsungen

nach Stillstand der Blutung wieder entnommen wurde, gestillt.

Die Empfängerblase wurde sowohl auf der der Implantationsseite gegenüberliegenden Seite, als auch auf der ipsilateralen Seite im apikalen Drittel stumpf durchstoßen und der Ureter durch die Blase hindurch auf die andere Seite nach außen gezogen. Mittels einer Overholt-Klemme wurde durch die der Operationsseite abgewandte Perforation in der Blase möglichst apikal etwas Serosa gegriffen und nach außen gezogen. An diesem Serosastück wurde der inzwischen ein Zentimeter lang geschlitzte Ureter mittels 4 Fäden Catgut* der Stärke 3-0 fixiert. Anschließend wurde die Blase mit dem gleichen Material verschlossen.

Nach Implantation des Ureters wurde der Empfänger beidseits nephrektomiert.

Das Transplantat wurde durch eine lockere Fixation des großen Netzes am hinteren Peritoneum vor Kontakt mit Dünn- und Dickdarm geschützt, um einen Adhäsionsileus zu vermeiden. Nach torsionsfreier Lagerung der Niere in der Fossa iliaca wurde der Bauchraum schichtweise verschlossen und die Operationswunde mittels eines atmungsaktiven, antiseptischen Sprühverbandes** abgedeckt.

4. Postoperative Pflege der Tiere

Direkt nach Transplantation erhielten die Empfängerhunde 200 ml Rheomakrode^Rx - 10 % mit Sorbit 20 %*** zur Ileusprophylaxe (167) und Flüssigkeitssubstitution.

Außerdem wurde ihnen eine i.v. Injektion von 3 mg/kg Körpergewicht Sisomicinsulfat**** und 20 ml des Analeptikums Bemegrid***** appliziert.

* Catgut 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt

** Nobecutan-Spray, Astra-Chemicals GmbH, Wedel (Holstein)

*** Rheomakrodex 10 % mit Sorbit 20 %, Knoll AG, Ludwigshafen

**** Extramycin, Bayer AG, Leverkusen

***** Eukraton, Nordmark-Werke GmbH Hamburg, Werk Uetersen

Ab dem 1. Tag postoperativ erhielten die Empfänger als antibiotische Prophylaxe 3 mg/kg Körpergewicht Sisomicinsulfat für 5 Tage.

Entsprechend dem Hämatokrit, der Flüssigkeits- und Nahrungszufuhr wurden die Tiere mit Tutofusin^{R*} und Glucose 5 %** intravenös substituiert.

Die Hunde wurden in klimatisierten Einzelboxen gehalten, hatten ab dem ersten Tag freien Zugang zu Wasser und erhielten einmal täglich Nahrung.

5. Explantation der Niere

Am 7. Tag erfolgte unter sterilen Kautelen die Explantation der Niere, nachdem unmittelbar vorher Blut für die Messung von Serumwerten, für hämatologische und immunologische Untersuchungen entnommen worden war.

Die Tiere erhielten intravenös 25 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium zur Narkose und wurden endotracheal intubiert. Nach gründlicher Desinfektion des Operationsgebietes wurde die Peritonealhöhle mittels eines Paramedianschnittes eröffnet. Diese Schnittführung wurde gewählt, um das Wundgebiet der Transplantation nicht zu tangieren und so eventuell pathogene Keime aus infizierten Wundtaschen nicht in die Bauchhöhle zu verschleppen.

Nach Mobilisierung der Niere wurde der Ureter abgesetzt, Arteria und Vena renalis mittels zweier Clover-Klemmen abgeklemmt und proximal reseziert.

Sofort nach Entnahme der Niere wurde diese mit 300 - 500 ml Elektrolytlösung, die auf 4° C abgekühlt war und 5000 Einheiten Heparin-Natrium enthielt, bis zur Blutleere perfundiert. Danach wurde das Explantat mit 500 ml Hank'scher Lösung***, die 5000 Einheiten Heparin-Natrium und 2 % "Antibiotic-Antimycotic-Solution"**** enthielt, äußerlich gewaschen. Abschließend wurde die Niere noch gewogen.

* Tutofusin, Pfrimmer & Co. Pharmazeutische Werke, Erlangen

** Glucose 5 %, B. Braun, Melsungen

*** Apotheke des Klinikums Großhadern der Universität München

****Gibco Bio Cult, Glasgow, Schottland

6. Bestimmungsmethoden:

Für sämtliche Serumanalysen und hämatologischen Untersuchungen wurde 1 Tag präoperativ und dann am 2., 4., 5. Tag und darauf täglich peripheres Venenblut entnommen.

a) Messungen

I. Harnstoff und Kreatinin im Serum:

Zur orientierenden Verlaufskontrolle nach Transplantation wurde der Serum-Harnstoff mittels Teststäbchen* bestimmt. Prinzipiell wurde die Bestimmung des genauen Serum-Harnstoff und -Kreatinin jedoch auch photometrisch** mit Hilfe einer Testkombination*** vorgenommen. Dies geschah nach Abschluß des Gesamtexperiments. Alle in Teil C (Ergebnisse) aufgeführten Werte wurden ausschließlich mit dieser Methode gemessen.

II. Serum-Natrium und -Kalium:

Die Bestimmung des Serum-Natriums und -Kaliums erfolgte flammenphotometrisch****.

III. Nierengewicht vor Transplantation und nach Explantation:

Jeweils nach Beendigung der Perfusion wurde das Gewicht der Niere vor Transplantation bzw. nach Explantation mit Hilfe einer elektronischen Waage***** mit Digitalanzeige ermittelt.

b) Hämatologische Untersuchungen

I. Leukozytenzahl:

Zur Leukozytenauszählung wurde Vollblut mit Essigsäure 3 % im Verhältnis 1 : 20 mittels einer Pipette verdünnt, in eine Thoma-Neubauerkammer gefüllt und unter dem Durchlichtmikroskop die Leukozyten ausgezählt.

* Merckognost-Harnstoff, Merck, Darmstadt

** Photometer PCP 6121, Eppendorf Gerätebau, Hamburg

*** Test-Combination Creatinin, Harnstoff, Boehringer, Mannheim

**** Emissionsflammenphotometer FCM 6341, Eppendorf Gerätebau, Hamburg

***** Mettler PL 1200, Mettler Waagen GmbH, Gießen

II. Thrombozytenzahl:

Zur Auszählung der Thrombozyten wurde Vollblut mit Ammoniumoxalat 1 % verdünnt. Nach Hämolyse der Erythrozyten wurden die Thrombozyten in der Neubauer-Kammer, nach 15-minütiger Lagerung in einer feuchten Kammer, unter dem Phasenkontrastmikroskop* ausgezählt.

III. Blutausstrich:

Zur Herstellung des Blutausstriches wurde ein Tropfen Vollblut auf einen gereinigten und entfetteten Objektträger aufgebracht, dünn ausgestrichen, an der Luft getrocknet, abschließend nach Pappenheim gefärbt und ein Differentialblutbild angefertigt.

IV. Hämatokrit:

Zur Hämatokritbestimmung wurden heparinisierte Glaskapillaren zu etwa 2/3 mit Vollblut gefüllt, auf einer Seite verschlossen und in einer Hämatokritzentrifuge** fünf Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert.

c) Histologische Untersuchungen

Nach Nephrektomie und Perfusion der Niere bis zur Blutleere wurde jeweils eine 5 mm dicke, sagittal geschnittene Gewebescheibe, die Nierenrinde, -mark- und -becken erfaßte, entnommen, in 5 % gepuffertem Formaldehyd fixiert und histologisch untersucht (195).

d) Immunologische Untersuchungen

Vorbemerkungen:

1. Isolation von Lymphozyten:

Die Separation der Lymphozyten erfolgte auf 2 Wegen.

* Carl Zeiss, Oberkochen

** Hettich Haematokrit, Hettich Zentrifuge, Tuttlingen

- a) Heparinisiertes venöses Vollblut wurde über Ficoll* der Dichte (D) 1,077 geschichtet und bei 2700 U/min für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert** (25). Der entstehende Interphasenring, der die Lymphozyten enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert und in Waschmedium*** resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann bei 1700 U/min für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen erneut mit Waschmedium resuspendiert und 8 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dann noch ein drittes Mal wiederholt und die Lymphozyten (nach Zählung in einer Neubauer-Kammer) mittels Kulturmedium**** auf eine Zellzahl von 1×10^6 /ml eingestellt.
- b) Wurden für die Tests Lymphozyten aus abgestoßenen Transplantaten verwandt, so wurden diese mittels der unter B 7) vorgestellten Methode separiert. Auch hier erfolgte eine abschließende Einstellung der Zellzahl auf 1×10^6 /ml.

* Apotheke des Klinikums Großhadern der Universität München

** Rotanta/S, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

*** Herstellung von Waschmedium;

1000 ml Aqua ad iniectabilia, B. Braun, Melsungen +

10,38 g RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin ohne NaHCO_3 , Seromed, München +

1,6 ml 1N HCl, Apotheke des Klinikums Großhadern der Universität München +

1 % "Antibiotic-Antimycotic-Solution", Gibco Bio Cult, Glasgow, Schottland +

25 ml Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) 8,4 %, Fresenius, Bad Homburg +

**** Kulturmedium = 9 Teile Waschmedium + 1 Teil foetales Kälberserum (Rehatuin F.S., distributed by Reheis Chemicals Company-Devison of Aemour Pharmaceutical Company, Phoenix, Arizona, USA)

2. Zellkultivierung:

Nachdem die Lymphozyten in die unten beschriebenen Teste I - III eingesetzt und die Microtestplatten mit einem Deckel verschlossen waren, wurden sie alle unter jeweils gleichen Kulturbedingungen gehalten, d. h. sie ruhten für die entsprechende Zeit erschütterungsfrei in einem luftdicht verschlossenen Begasungsbrutschrank*, der auf 37° C temperierte Luft, angereichert mit 5 Vol. % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 %, enthielt.

Circa 16 Stunden vor Ablauf der jeweiligen Kulturzeit wurden die Zellen mit 1 µCi/well ³H-Thymidin**, das dabei in die DNS der sich in Mitose befindenden Zellen eingebaut wird, inkubiert.

Am Ende der Kultivierung wurden die Zellen mit den Microtestplatten eingefroren.

3. "Zellernte" und Messung des radioaktiven Einbaus in die Lymphozyten:

Hierzu wurden die sich in den Microtestplatten befindenden Zellen zunächst aufgetaut und mittels einer "Erntemaschine"*** die Zellen auf kleine runde Filterplättchen gebracht.

Diese wurden bei 30° C getrocknet und anschließend einzeln in Plastikröhrchen (Minivial), die jeweils 3 ml Scintillationsflüssigkeit**** enthielten, plaziert.

Da ³H-Thymidin ein β-Strahler ist, wurde die vorhandene Strahlenintensität in einem "Flüssigkeitsszintillationszähler"***** jeweils für eine Minute gemessen und die Impulsrate als Counts/min automatisch ausgedruckt.

Alle Messungen wurden zweimal vorgenommen.

* Heraeus, Hanau

** Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig

*** Mash II, Dynatech

**** 0,20 g POPOP + 20,00 g PPO ad 5 Liter Toluol

***** Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Typ 3255, Packard, Chicago, Illinois, USA

Die im Folgenden beschriebenen Testansätze I - III wurden ausnahmslos unter keimfreien Bedingungen an sogenannten "Flow-Tischen"* ausgeführt.

I. Mitogenstimulationsteste:

Als Mitogene dienten Phytohaemagglutinin (PHA)**
 Pokeweed Mitogen (PWM)***
 und Concanavalin A (ConA)****

Bei allen drei handelt es sich um Phytomitogene (= Lektine), d. h. Mitogene, die aus Pflanzen isoliert wurden (151, 159, 219).

PHA wird aus *Phaseolus vulgaris* (209), PWM aus *Phytolacca Americana* (73, 271) und Con A (182) aus *Canavalis ensiformis* gewonnen.

In Microtestplatten*****, die 96 Vertiefungen ("wells") mit rundem Boden hatten, wurden je "well" 1×10^5 Lymphozyten (in 0,1 ml Kulturmedium) pipettiert und mit weiteren 0,1 ml Kulturmedium in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml Kulturmedium suspendiert.

Zu diesen Zellen wurde im nächsten Schritt mittels einer Präzisionspipette***** entweder 0,02 ml PHA (0,4 µg/well), PWM oder Con A (0,8 µg/well) gegeben - jeweils als Dreifachbestimmung. Als Kontrolle dienten 1×10^5 Lymphozyten in 0,2 ml Kulturmedium ohne Zusatz von Mitogenen.

Die Kulturzeit betrug 72 Stunden.

* - Holten Lamin Air HLB 2 448, Allerød, Dänemark

- Lamin-Flow, Typ Envirco, CEAG, Dortmund

** Phytohaemagglutinin purified, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England

*** Pokeweed Mitogen(PWM) lyophilisiert, Paesel GmbH & Co., Frankfurt/M.

**** Concanavalin A, Carl Roth, Karlsruhe

***** Nunclon-Microtestplatte, Nunc-Intermed, Roskilde, Dänemark

***** Hamilton & Co. Inc., Whittier, Californien, USA

II. Gemischte Lymphozytenkultur (MLC):

Dieser Test wurde in Modifikation (95, 112) der Methode erstmals beschrieben von B. Bain (12) angewandt.

Hierbei wurden periphere Lymphozyten von Spender (SpL) und Empfänger (EL) und nach Explantation auch aus der Niere separierte Niereninfiltratlymphozyten (NL) verwendet.

Jeweils die Hälfte der vorhandenen Zellen wurde mit 2000 rad (Caesiumstrahlung) bestrahlt. Damit konnten diese Lymphozyten nicht mehr proliferieren, wohl aber noch einen antigenen Stimulus auf allogene nicht bestrahlte Partner-Lymphozyten (Responder) ausüben. Es handelte sich hierbei also um eine sogenannte "one-way-MLC" (132).

Auch hier wurden Microtestplatten verwendet.

Tab. 1: Pipettierschema für die "Gemischte Lymphozytenkultur":

Vor TP			Nach Transplantatentnahme		
SpL	+	EL _x	SpL	+	EL _x
SpL	+	NL _x	SpL	+	NL _x
SpL	+	SpL _x	SpL	+	SpL _x
EL	+	SpL _x	EL	+	SpL _x
EL	+	NL _x	EL	+	NL _x
EL	+	EL _x	EL	+	EL _x
			NL	+	EL _x
			NL	+	SpL _x
			NL	+	NL _x

SpL = Spenderlymphozyten

EL = Empfängerlymphozyten

NL = Nierenlymphozyten

x = bestrahlt mit 2000 rad

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wurden 1×10^5 Lymphozyten des Hundes A (Responder) und 1×10^5 bestrahlte Zellen des Hundes B zusammen in eine Vertiefung pipettiert, so daß ein Gesamtvolumen von 0,2 ml resultierte.

Als Kontrolle diente hier die Mischung von bestrahlten und nicht bestrahlten Lymphozyten des gleichen Tieres. Jeder Testansatz wurde als Dreifachbestimmung angelegt. Die Kulturzeit betrug hier 5 Tage (120 Stunden).

III. "Suppressor-Helfer-Zell-Assay":

Mit Hilfe dieses Testsystems sollten die peripheren und die in die Niere infiltrierte Lymphozyten auf ihre Regulatorfunktion im Rahmen der Abstoßungsreaktion untersucht werden. Näheres hierzu siehe Diskussion.

Die Methodik des Testansatzes war identisch mit dem unter 6 d) II beschriebenen, nur daß hier noch ein dritter bestrahlter Partner (entweder EL, NL oder SpL) in das System eingeführt wurde.

Dies geschah nach folgendem Schema:

Tab. 2: Pipettierschema für das "Suppressor-Helfer-Zell-Assay":

Vor TP				Nach Transplantatentnahme			
EL	+	SpL _x	+	EL _x	EL	+	SpL _x + EL _x
					EL	+	SpL _x + NL _x
SpL	+	EL _x	+	SpL _x	SpL	+	EL _x + SpL _x
					SpL	+	EL _x + NL _x

SpL = Spenderlymphozyten

NL = Nierenlymphozyten

EL = Empfängerlymphozyten

x = bestrahlt mit 2 000 rad

Die Kulturbedingungen und -dauer stimmten mit denen, die bei der MLC beschrieben wurden, überein.

Alle unter 6 d) I - III aufgeführten Teste wurden sowohl vor Transplantation, als auch nach Nephrektomie und Separation der Niereninfiltratlymphozyten ausgeführt.

IV. Immunfluoreszenzmikroskopie:

Mit dieser Methode wurden die gewonnenen Niereninfiltratlymphozyten auf ihren Oberflächen auf IgG-Moleküle hin untersucht, d. h. auf B-Lymphozytencharakteristika (172). Dazu wurde eine kleine Probe der zu untersuchenden Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit fluoreszierendem Anti-Hunde-IgG* (Verdünnung 1 : 16) vom Kaninchen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal für je 5 Minuten bei 1500 U/min mit Waschmedium gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ** wurden die Anti-Hunde-IgG tragenden Zellen mit ultravioletter Licht zur Fluoreszenz angeregt und ihre Zahl in Prozent zu nicht fluoreszierenden Zellen angegeben.

7. Separation der in die abgestoßenen Nieren eingewanderten Zellen:

Die Isolation der Niereninfiltratlymphozyten erfolgte nach vielfältigen Modifikationen in Anlehnung an eine Methode, die 1977 von C.B.Hansen et al. (107) zur Separation von Lymphozyten aus Mäusetumoren beschrieben wurde.

* FITC-conjugiertes Anti-Hunde-IgG vom Kaninchen, Miles-Yeda Ltd., Israel

** Fluoreszenzmikroskop, Okular: 10 x, Objektive: Neofluar 25/0,60, Plan-Neofluar 25/0,8 W-Oel, Plan 40/0,65, Carl Zeiss, Oberkochen

Vorbemerkungen zu Sephadex-G 10:

Sephadex*, erstmals eingeführt 1959, ist ein kugelförmiges Dextrangel, das durch Quervernetzung bestimmter Dextranfraktionen mit Epichlorohydrin hergestellt wird.

Da die Polysaccharidketten (Dextran) einen hohen Gehalt an Hydroxylketten aufweisen, ist Sephadex stark hydrophil. Aus diesem Grund muß Sephadex vor Gebrauch zunächst in Aqua dest. quellen.

Die verschiedenen Sephadexsorten unterscheiden sich in eben diesen Quelleigenschaften. Um diese Fähigkeit zu quellen näher zu charakterisieren, wurde ein "Wasser-Wiedergewinn-Wert" eingeführt, der ein Maß für die Menge Wasser ist, die ein trockenes Sephadexkügelchen beim Quellen in sich aufnehmen kann. Das Wasser zwischen den Kügelchen ist in diesem Wert nicht enthalten. Die Zahlen hinter dem G (Sephadex-G 10, 15 etc.) beziehen sich auf diesen Wert. So nimmt z. B. 1 Gramm trockenes Sephadex-G 10 beim Quellen 1 ml Wasser in sich auf. Da aber noch das Wasser zwischen den Sephadex-Körnchen dazu kommt, rechnet man für 1 Gramm trockenes Sephadex-G 10 ein Säulenvolumen von 2 - 3 ml (51, 123).

a) Vorbereitung der Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule:

Die Aufgabe dieser Säule war es, adhärente Zellen (Monozyten, Makrophagen) und größere Zellen wie Nierenzellen und Granulozyten aus einer zuvor hergestellten Nierensuspension zu entfernen und so eine möglichst reine Lymphozytenpopulation zu gewinnen.

Die Herstellung und der Aufbau der Säulen (Abb. 1) erfolgte in Abänderung früher angegebener Methoden (107, 158) wie folgt:

Sephadex-G 10 wurde in einem sterilen Becherglas mit Aqua bidest., das 0,01 % Natriumazid (NaN_3)** enthielt, für mindestens 24 Stunden Gelegenheit gegeben zu quellen. Die Wassermenge entsprach dem 4-fachen Volumen, das das Sephadex-G 10

* Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg

** E. Merck, Darmstadt

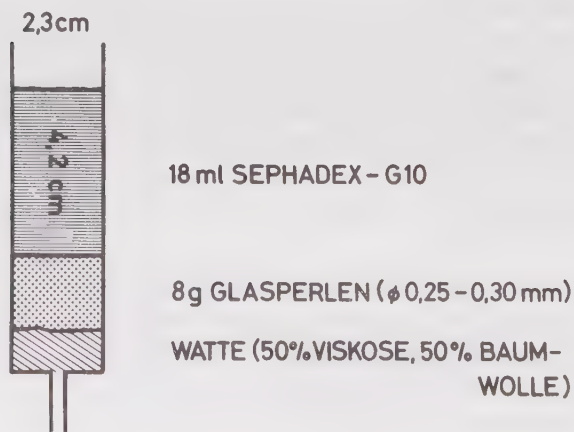
in gequollenem Zustand einnehmen würde.

Durch die bakterizide Wirkung des NaN_3 wurde das Sephadex gleichzeitig gegen Keime geschützt und konnte so auch über längere Zeiträume im Kühlschrank bei 4°C ohne bakteriellen Befall aufbewahrt werden.

Als Säulen wurden sterile Plastikspritzen* mit einem Volumen von 30 ml - bei einem Innendurchmesser von 2,3 cm - verwendet, die unten mit einem Dreiwegehahn versehen waren.

Abb. 1: Aufbau einer "Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule":

SEPHADEX - G10-GLASPERLEN-SÄULE



Die unterste Lage der Säule wurde von einer 2 mm dicken Wattes-
schicht (50 % Viskose, 50 % Baumwolle)** gebildet und sollte
primär die darüber befindlichen Glasperlen daran hindern,
durch den Ausfluß der Säule zu fallen.

* Terumo Syringe, Terumo Corporation, Tokyo, Japan

** Hartmann AG, Heidenheim/Brenz

Über diese Schicht wurden im nächsten Schritt 8 Gramm sterilisierte Glasperlen* ($\emptyset$ 0,25 - 0,30 mm), die zuvor gründlich in PBS** (Phosphate-buffered saline) gewaschen wurden, pipettiert.

Daraufhin wurde der Dreiwegehahn geschlossen, 10 ml PBS in die Säule pipettiert und die Glasperlen vorsichtig mit 18 ml gequollenem und sterilem Sephadex-G 10 überschichtet.

Anschließend wurde die Säule mit mindestens 100 ml Aqua ad iniectabilia, das wiederum 0,01 % NaN₃ enthielt, durchgewaschen, um etwaigen bei der Präparation der Säule entstandenen Kontaminationen zu begegnen.

Nachdem die Säule nach oben steril verschlossen war, wurde sie im Kühlschrank bei 4° C gelagert (jedoch nicht länger als 3 Tage).

Vor Gebrauch wurde die Sephadex-G 10-Säule zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit 300 ml warmem Waschmedium gewaschen.

Für jedes Experiment wurden 6 solcher Säulen verwendet.

b) Herstellung eines Nierenhomogenisates:

Das perfundierte Nierenexplantat wurde in kleine Stücke gewürfelt und vorsichtig durch ein käufliches Edelstahlgitter (Maschengröße 1 x 1 mm) passiert. Dies geschah in Anwesenheit von Waschmedium + 5 % inaktiviertem FCS*** + 10000 Einheiten Heparin-Natrium pro 1000 ml (= Waschmedium II).

Der durch diese Prozedur erhaltene Gewebebrei wurde im Folgenden auf ein Volumen von durchschnittlich 300 ml mit Waschmedium II aufgeschwemmt und für 25 Minuten unter ständigem Rühren durch ein elektrisches temperierbares Rührgerät**** bei 20° C mit Enzymen inkubiert.

* B. Braun Melsungen-Apparatebau, Melsungen

** Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München

*** 30 Minuten bei 56° C

**** IKA Combining Red, Jnke & Kunkel KG, IKA Werk, Staufen

Bei diesen Enzymen handelte es sich im einzelnen um:
Pronase*, Collagenase**, Trypsin*** (jeweils 0,1 mg/ml) und
um DNase**** (0,025 mg/ml).

Nach Inkubation wurden die Enzyme sofort durch Zugabe von
10 % inaktiviertem FCS und weiterer Verdünnung des Gewebe-
breies mit Waschmedium II gebremst und die Enzyme mittels
dreimaliger 10-minütiger Zentrifugation bei 1600 U/min aus-
gewaschen.

Im Anschluß daran wurden die Überstände sämtlicher Zentrifu-
gate verworfen, alle Zellen gemischt ("gepoolt") und erneut
auf ein adäquates Volumen resuspendiert.

Das nun enzymfreie Nierenhomogenisat wurde im folgenden
Schritt durch ein Drahtsieb (Maschengröße 0,5 x 0,5) gefil-
tert, wobei das im Sieb zurückbleibende Gewebe gründlich mit
Waschmedium II gespült wurde, um möglichst alle freien Zellen
zu gewinnen.

Im Sieb zurück blieb in der Hauptsache Bindegewebe des Kelch-
und Beckensystems der Niere.

Nach diesem Arbeitsgang betrug das durchschnittliche Volumen
der Zellsuspension 800 ml.

* Pronase P, lyophilisiert, reinst, Protease aus *Streptomyces griseus*;
Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

** Collagenase von *Clostridium histolyticum*, 0,36 U/mg Material, reinst,
240 "Mandl-units"/mg Material; Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

*** Trypsin, 1 : 250, aus Rinderpankreas, 4 U/mg Material, Serva-Fein-
biochemica, Heidelberg

**** Deoxyribonuclease I (DNase I, Deoxyribonucleate 5' - oligonucleoti-
dohydrolase, E.C.No. 3.1.4.5.) aus Rinderpankreas Typ III, das lyo-
philisierte Pulver enthält ca. 95 % Protein; Sigma Chemical Company,
St. Louis, MO 63178, USA

c) Filtration der Nierensuspension durch ein Mikrofiltrationsgerät:

Ziel dieses Filtrationsschrittes war es, Nierenzellverbände, einzelne Nierenzellen, Zellklumpen und große Leukozyten aus der Zellsuspension zu entfernen.

Hierbei wurde das Nierenhomogenisat durch ein "Mikrofiltrationsgerät*", wie es bei Bluttransfusionen Verwendung findet, gefiltert.

Es handelt sich hierbei um eine reine Siebfiltration, d.h. der Filter besteht aus 4 hintereinander geschalteten Sieben mit gestaffelten Maschenweiten von 200 μm (83 cm^2), 50 μm (72 cm^2), 20 μm (62 cm^2) und 10 μm (52 cm^2) (Abb. 2).

Da diese Siebfilter nach dem Kaskadenprinzip angeordnet sind, resultiert eine selektive Filterbeladung und eine fraktionierte Filtration der Zellsuspension.

Nachdem ein gewisses Quantum des Nierenhomogenisates in den Filter gegeben war, wurde dieser gründlich mit Waschmedium II gespült, um möglichst alle Zellen, denen ihre Größe erlaubte, die Filter zu passieren, zu gewinnen.

Sobald der Durchfluß stagnierte, wurde der Filter verworfen und durch einen neuen ersetzt.

Die resultierende Spülflüssigkeit betrug nach Abschluß der Filtration durchschnittlich 2 Liter und wurde in einer großvolumigen Zentrifuge** für 20 Minuten bei 1500 U/min ohne Bremse zentrifugiert.

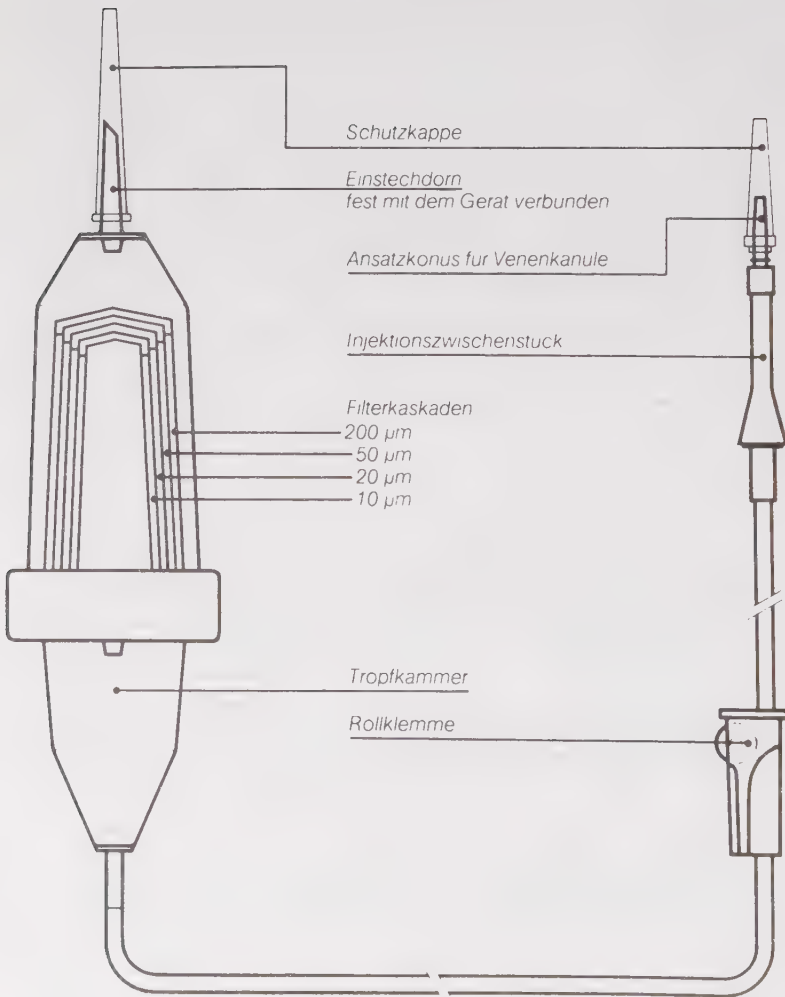
Die Überstände wurden verworfen, die Zellen resuspendiert und auf eine Zellzahl von $1 \times 10^7/\text{ml}$ eingestellt.

* Microfiltrationsgerät MF 10 B, Biotest-Serum-Institut, Frankfurt

** Fa. Christ

Abb. 2: Mikrofiltrationsgerät MF 10 B*:

Mikrofiltrationsgerät MF 10



* Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Biotest-Serum-Institut, Frankfurt

d) Lymphozytenanreicherung mittels Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule:

Nach Justierung der gebrauchsfertigen Säulen in senkrechter Position wurden auf die Oberfläche jeder Säule 20×10^6 Zellen pipettiert.

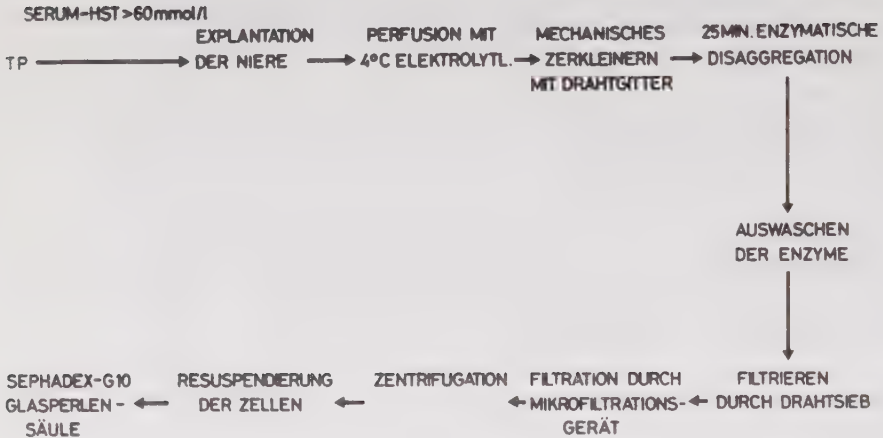
Waren die Zellen in das Sephadex-G 10-Bett eingewandert, wurde der Dreiwegehahn geöffnet und die erste Fraktion mit 25 ml Waschmedium III* ausgewaschen. Darauf wurde der Hahn kurz geschlossen, 5 ml Waschmedium III auf die Säule pipettiert und die obere Hälfte der Säule vorsichtig mit einem Glasstab umgerührt. Nachdem weitere 10 ml Waschmedium III einpipettiert waren, wurde der Dreiwegehahn wieder geöffnet und das Eluat als Fraktion 2 aufgefangen.

Das Eluat aller Säulen wurde gepoolt und nach 7-minütiger Zentrifugation bei 1500 U/min die Pellets in Kulturmedium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Abb. 3 zeigt die Methodik der Lymphozytengewinnung aus abgestoßenen Nierentransplantaten zusammenfassend schematisch im Überblick:

* Waschmedium + 10 % inaktiviertes FCS + 10 000 Einheiten Heparin-Natrium pro 1 000 ml = Waschmedium III

Abb. 3: Methodik der Lymphozytenseparation:



e) Untersuchung der gewonnenen Zellen:

I. Charakterisierung:

Von den separierten Zellen wurde jeweils ein luftgetrocknetes Präparat hergestellt. Dieses wurde in 70 %igem Methylalkohol fixiert, kurz in Giemsa-Farblösung getaucht und mit Wasser gespült.

II. Vitalität:

Nach jedem Experiment wurden die Zellen mittels Trypan-Blau-Färbung* auf ihre Vitalität hin untersucht. Lebende Zellen erscheinen hierbei unter dem Mikroskop ungefärbt, während abgestorbene Zellen mit Membrandefekten sich blau anfärben.

* Fa. Fluka, Buchs, Schweiz

8. Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten wurde mit Hilfe eines programmierbaren Rechners vorgenommen.

Berechnet wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$), die Standardabweichungen (s_x) und der mittlere Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$).

C ERGEBNISSE

1. Allgemeines und Vorversuche:

Insgesamt wurde 32 Hunden eine allogene Niere transplantiert. Von diesen verstarben postoperativ 9 Tiere vorzeitig an interkurrenten Komplikationen, bevor sie Zeichen der Transplantatabstoßung zeigten und somit explantiert werden konnten (Tab. 3). Bei der abschließenden Obduktion dieser Hunde fanden wir in 4 Fällen einen Ileus als Todesursache, bei 2 Tieren lag eine Thrombosierung der Nierengefäße mit konsekutiver Urämie vor, 1 Hund verstarb an Urämie infolge einer Abknickung der Nierengefäße, 1 Tier erlag einer eitrigen Peritonitis und in einem Fall konnten wir keine unmittelbare Todesursache feststellen.

Tab. 3: Todesfälle durch postoperative interkurrente Komplikationen

Hund Nr.	Ueberlebens- zeit (Tage)	Serum-Harnstoff z. Todeszeitpunkt mmol/l	Todesursache
3	5	46,62	Ileus
5	2	26,64	Ileus
6	3	38,30	Peritonitis
10	5	114,89	Thrombosierung d. Anastomosen
14	4	48,29	?
16	3	14,15	Ileus
20	5	103,23	Thrombosierung d. Anastomosen
24	4	39,96	Ileus
29	4	> 99,90	Abknickung d. Nieren- gefäße

Eine Reihe von 12 Pilotversuchen (Tab. 4) war nötig, um die hier vorgestellte Methode der Lymphozytenseparation aus abgestoßenen Nierentransplantaten bis zu einem reproduzierbaren Standard zu entwickeln, der den Forderungen nach hoher Lymphozytenausbeute und -reinheit, unverfälschtem T- zu B-Lymphozytenverhältnis, hoher Vitalität, Mitogenstimulierbarkeit und Sterilität genügte.

Tab. 4: Pilotversuche

Hund Nr.	Methodik d. Lymphozytenseparation	Lymphozytenausbeute ($\times 10^6$)
1	Ficoll (D = 1,077)	5,0
2	Ficoll (D = 1,077)	8,0
4	Ficoll (D = 1,077)	7,0
7	Ficoll (D = 1,045 - 1,092)	4,5
8	Ficoll (D = 1,045 - 1,092)	5,0
9	Dextran 250 000 3 %	2,5
11	Dextran 250 000 3 %	3,1
12	Sephadex-G10-Glasperlen-Säule	11,0
13	Sephadex-G10-Glasperlen-Säule	15,0
15	Sephadex-G10-Glasperlen-Säule	14,0
17	Sephadex-G10-Glasperlen-Säule	25,0
18	Sephadex-G10-Glasperlen-Säule	30,0

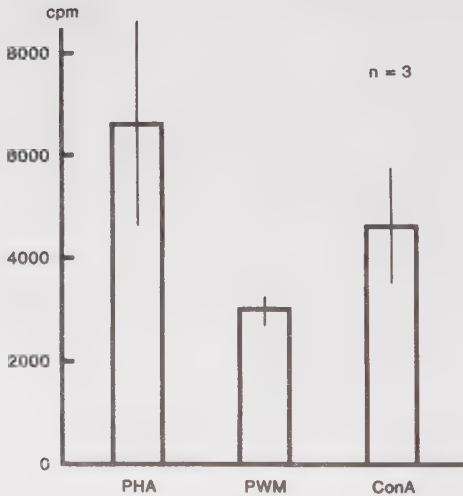
In ersten Vorversuchen (n = 3) wurden die Nieren mechanisch zerkleinert, enzymatisch aufgespalten und in einer adäquaten Menge Waschmedium suspendiert.

Diese Zellen wurden dann über Ficoll (D = 1,077) separiert. Die Lymphozytenausbeute bei diesem Verfahren war mit $6,6 \pm 1,5 \times 10^6$ Zellen zu niedrig. Die Mitogenstimulierbarkeit der Lymphozyten (Abb. 4) war ebenfalls unbefriedigend.

Da die gewonnenen Lymphozyten stets noch stark mit Zellklumpen, Nierenparenchymzellen, Granulozyten und Zellfragmenten verunreinigt waren, war eine fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Präparate hinsichtlich ihres B-Lymphozytengehaltes nicht möglich.

Die Vitalität der gewonnenen Zellen lag bei $70 \pm 5 \%$.

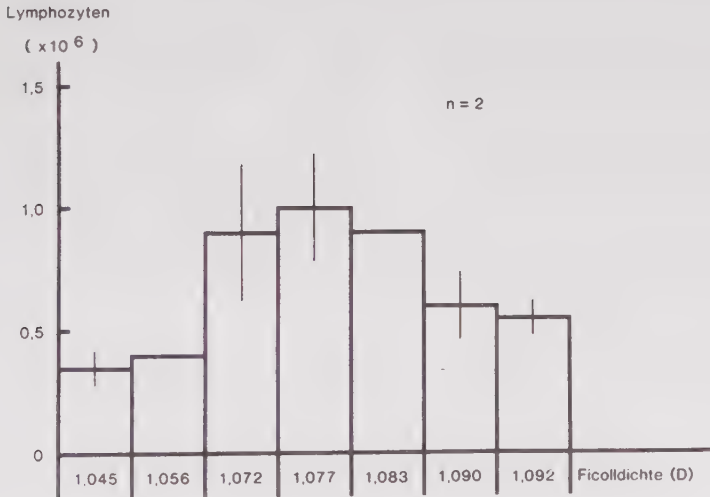
Abb. 4: Mitogenstimulierbarkeit von Lymphozyten nach Separation durch Ficoll ($D = 1,077$).



In der nächsten Versuchsanordnung ($n = 2$) wurden sämtliche Ficolldichten, die zur Verfügung standen ($D = 1,045; 1,056; 1,072; 1,077; 1,083; 1,090; 1,092$) auf ihre Fähigkeit geprüft, aus dem Nierenhomogenisat Lymphozyten zu separieren. Jede Ficolldichte wurde 4 mal angesetzt und jeweils mit 5 ml Zellsuspension beschickt.

Die Lymphozytenausbeute bei den einzelnen Dichten ist aus Abb. 5 ersichtlich.

Abb. 5: Lymphozytenausbeute bei verschiedenen Ficolldichten



Wie in Abb. 5 zu erkennen ist, lag der Bereich der höchsten Lymphozytenausbeute zwischen $D = 1,072$ und $1,083$. Links und rechts davon, also im Bereich kleinerer bzw. größerer Dichte, nahm die Effizienz der Separation auf fast die Hälfte ab. Die höchsten Zellgewinne konnten mit Ficoll der Dichte $D = 1,077$ erzielt werden, während der Gradient mit der Dichte $D = 1,045$ die niedrigste Lymphozytenausbeute erbrachte. Wurden die Lymphozyten, die durch die verschiedenen Ficolldichten separiert worden waren, gepoolt, so ergab sich eine Zellzahl von $4,75 \pm 0,35 \times 10^6$ und diese war damit um 28 % geringer, als bei ausschließlicher Separation über Ficoll der Dichte $1,077$.

Die Vitalität der Lymphozyten betrug $75 \pm 7 \%$.

Die Immunfluoreszenz konnte in beiden Fällen beurteilt werden und ergab einen T-Lymphozytenanteil von $87,5 \pm 3,5 \%$.

Die Mitogenstimulierbarkeit der gepoolten Lymphozyten lag in dem selben Größenbereich, der sich auch für die Lymphozyten ergeben hatte, die ausschließlich über Ficoll der Dichte 1,077 gewonnen worden waren.

Auch in dieser Versuchsanordnung waren die Lymphozytenpräparationen in beträchtlichem Umfang mit anderen Zellen und Zellverbänden verunreinigt.

In weiteren Experimenten ($n = 2$) versuchten wir die Lymphozyten zu separieren, indem wir das Nierenhomogenisat über Dextran 250 000 der Konzentration 3 % schichteten und bei 1 G sedimentieren ließen. Der Überstand wurde abgehoben und da er stets sehr stark verunreinigt war, noch über Ficoll ($D = 1,077$) zentrifugiert.

Die sehr spärliche Lymphozytenausbeute betrug hier nur $2,8 \pm 0,4 \times 10^6$ mit der höheren Vitalität von $87,5 \pm 3,5$ %. Die Stimulierbarkeit durch Mitogene war niedriger als bei Separation über Ficoll und betrug für PHA 4581 ± 417 , für PWM 4557 ± 447 und für ConA 3846 ± 518 , bei einem Kontrollwert von 405 ± 74 (Tab. 5).

Tab. 5: Pilotversuche - Ergebnisse der Lymphozytenseparation und Mitogenstimulierbarkeit.

Methodik	Lymphozyten ($\times 10^6$)	Lymphozyten / Gramm Niere ($\times 10^3$)	Vitalität %	Mitogenstimulierbarkeit			
				PHA	PWM	ConA	Kontr.
Ficoll $D = 1,077$ ($n = 3$)	$6,67 \pm 1,53$	66 ± 12	70 ± 5	6570 ± 2020	3009 ± 306	4654 ± 1160	479 ± 191
Ficoll $D = 1,045 - 1,092$ ($n = 2$)	$4,75 \pm 0,35$	36 ± 1	75 ± 7	6139 ± 94	4047 ± 60	5718 ± 892	374 ± 173
Dextran 250 000 ($n = 2$)	$2,80 \pm 0,42$	20 ± 15	$87,5 \pm 3,5$	4581 ± 417	4557 ± 447	3846 ± 518	405 ± 74

Wie bei den vorausgegangenen Versuchen mußten wir auch hier trotz zusätzlicher Zentrifugation über Ficoll sehr starke Verunreinigungen durch unerwünschte Zellpopulationen feststellen.

In Tab. 5 sind die wichtigsten Ergebnisse der besprochenen Methoden vergleichend zusammengestellt.

Ficoll ($D = 1,077$) erwies sich in bezug auf die Lymphozytenausbeute als am besten geeignet. Der Lymphozytengewinn pro Gramm aufgearbeitetes Nierengewebe betrug hier $6,6 \times 10^4$ Zellen, während bei Separation über Dextran 250 000 nur $2,0 \times 10^4$ Lymphozyten aus einem Gramm Nierengewebe isoliert werden konnten.

Mit Ficoll ($D = 1,077$) konnten also ca. 3 mal soviel Lymphozyten separiert werden als mit Dextran 250 000.

Hingegen hatten die Lymphozyten, die mittels Dextran isoliert wurden, mit $87,5 \pm 3,5$ % eine um 17 % bessere Vitalität als die Zellen, die über Ficoll ($D = 1,077$) gewonnen worden waren. Betrachtet man die Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Mitogene, so zeigte sich auch hier Dextran dem Ficollgradienten unterlegen.

Nachdem die oben beschriebenen Separationsmethoden nicht die in sie gesetzten Erwartungen erfüllt hatten, wurde begonnen, die Lymphozyten aus dem Nierenhomogenisat zu isolieren, indem sie nach einer von C.B.Hansen beschriebenen Technik mittels Sephadex-G 10-Glasperlen-Säulen von anderen Zelltypen getrennt wurden.

Jedoch bedurfte es einiger Modifikationen der Methodik, um die Lymphozytenausbeute und -stimulierbarkeit zu optimieren. So wurden von uns 2 weitere Filtrationsschritte (1. Edelstahlgitter 1×1 mm; 2. "Mikrofiltrationsgerät") in den Separationsablauf integriert, die Sephadex-G 10 Menge auf 18 ml und das Glasperlengewicht auf 8 Gramm pro Säule reduziert.

Durch diese Abänderungen der Separationstechnik gelang es, die Lymphozytenausbeute von anfangs 11×10^6 auf $52 \pm 15 \times 10^6$ zu steigern.

Nach diesen Vorversuchen ($n = 5$) stand uns eine Methode zur Verfügung, die unseren Anforderungen gerecht wurde.

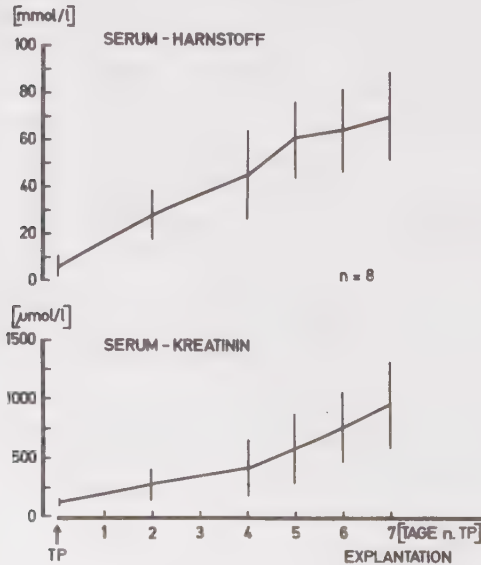
Alle weiteren Ergebnisse beziehen sich nur noch auf die Hunde ($n = 8$), aus deren abgestoßenen Nierentransplantaten Lymphozyten mittels der modifizierten Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule isoliert werden konnten.

2. Ergebnisse der Messungen:

I. Harnstoff und Kreatinin im Serum:

Abb. 6 zeigt Serum-Harnstoff und -Kreatininwerte der Hunde zum Zeitpunkt der Explantation.

Abb. 6: Postoperativer Verlauf der Serum-Harnstoff- und Serum-Kreatinin-Spiegel



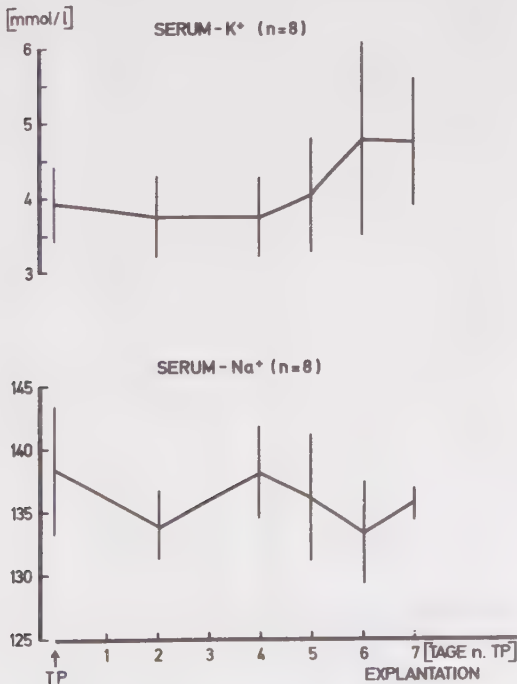
Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, stiegen sowohl die Serum-Harnstoffspiegel als auch die -Kreatininwerte der nicht immunsuppressiv behandelten Hunde bis zum 7. Tag kontinuierlich an, ohne ein Plateau zu erreichen.

Bei Explantation hatten die Tiere einen Serum-Harnstoffspiegel von $76 \pm 13,8$ mmol/l und einen Kreatininwert von 946 ± 361 μ mol/l.

II. Serum-Natrium:

In Abb. 7 ist der postoperative Verlauf des Serum-Natriumgehaltes nach Transplantation (TP) bis zur Explantation aufgetragen.

Abb. 7: Postoperativer Verlauf der Serumelektrolyte Natrium und Kalium.



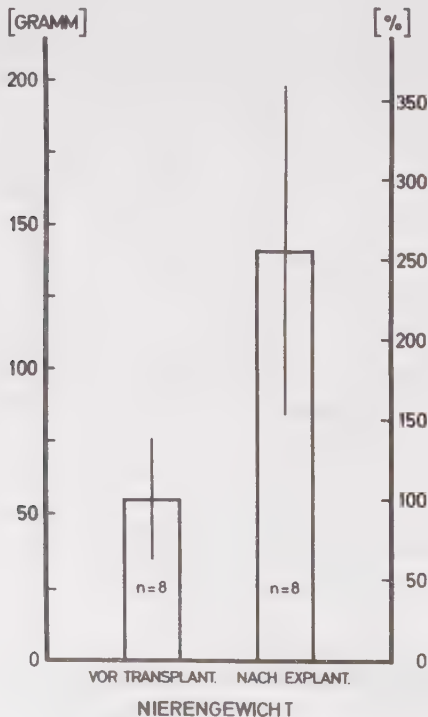
Die Abbildung zeigt, daß die Serumkonzentration von Na^+ durch die Transplantation, abgesehen von leichten Schwankungen, unbeeinflußt blieb.

III. Serum-Kalium:

Der Serumkaliumspiegel stieg postoperativ ab dem 4. Tag an, erreichte zwischen dem 5. und 6. Tag Werte von 4,7 mmol/l und ging vom 6. Tag bis zur Explantation in ein Plateau über (Abb. 7).

IV. Nierengewicht vor Transplantation und nach Explantation:

Betrachtet man das Gewicht der Nieren, gewogen jeweils nach Perfusion bis zur Blutleere, vor Transplantation und nach Explantation, so ergibt sich folgendes Bild (Abb. 8):



Vor Transplantation hatten die Nieren ein durchschnittliches Gewicht von 55 ± 21 Gramm und nach Explantation, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Abstoßung in vollem Gange war, ein Gewicht von 141 ± 57 Gramm.

Das bedeutet eine Gewichtszunahme von 86 Gramm oder 256 % des Ausgangswertes in rund 7 Tagen.

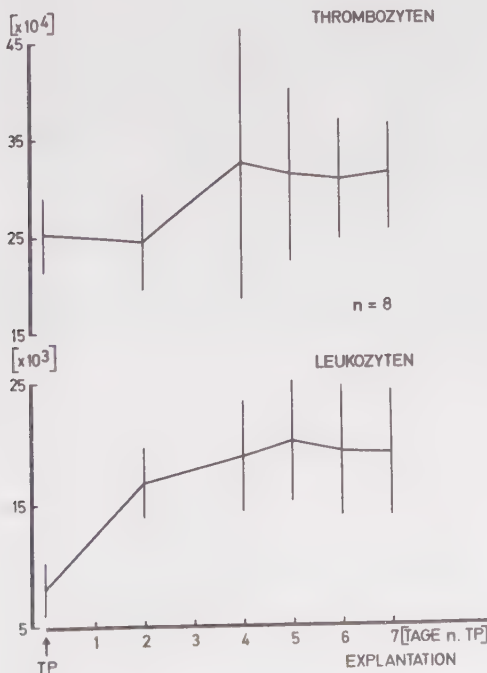
Eine Korrelation zwischen besonders schnellem Anstieg von Serum-Harnstoff bzw. -Kreatinin und hohem Nierengewicht bei Explantation konnte nicht beobachtet werden.

3. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen:

I. Leukozyten- und Thrombozytenzahl:

Aus Abb. 9 ist der postoperative Verlauf der Leukozyten bzw. Thrombozyten im peripheren Blut zu entnehmen.

Abb. 9: Postoperativer Verlauf der Leukozyten- und Thrombozytenzahl



Die Thrombozyten der Hunde blieben von der Transplantation (TP) relativ wenig beeinflusst.

Ausgehend von einem Leerwert am Tag 0 von $254 \pm 41 \times 10^3/\text{mm}^3$ erreichten sie am 4. Tag ein Maximum bei $332 \pm 148 \times 10^3/\text{mm}^3$ und pendelten um diesen Wert bis zur Explantation.

Wie den Standardabweichungen zu entnehmen ist, waren die individuellen Werte starken Schwankungen unterworfen.

Anders verhielten sich die Leukozyten. Schon am 2. Tag manifestierte sich eine massive Leukozytose, die am 5. Tag in ein Plateau bei $21,5 \pm 5 \times 10^3/\text{mm}^3$ überging.

Bei einem Ausgangswert von $8 \pm 2,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ vor Transplantation entspricht dies einer Zunahme der Leukozytenzahl um 269 %.

II. Blutaussstrich:

Im Differentialblutbild war im Vergleich zu Normwerten (1) eine leichte "Linksverschiebung" festzustellen, d.h. es traten vermehrt stabkernige Granulozyten im peripheren Blut auf.

Sie erreichten bei Explantation einen Anteil von $15 \pm 7 \%$, von einer konsekutiven Abnahme der segmentkernigen Granulozyten begleitet. Vor Transplantation lagen sie mit $11 \pm 8 \%$ im Bereich der Norm.

Alle anderen Zelltypen blieben von der Transplantation weitgehend unbeeinflusst und im Normbereich.

III. Hämatokrit:

Die Hämatokritwerte der Hunde blieben auch nach Transplantation auf Grund der HK-gesteuerten Elektrolytzufuhr weitgehend stabil und betrugen stets ca. 40 %.

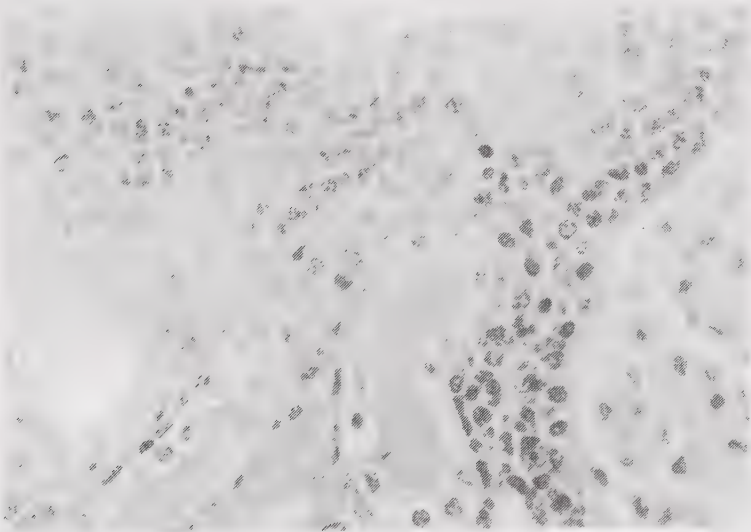
4. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen:

Bei der histopathologischen Untersuchung der Nieren waren in der Nierenrinde und in geringerem Umfang auch in den rinden-nahen Anteilen des Nierenmarks zahlreiche, fleckförmige zell-dichte interstitielle Infiltrate von mononukleären, pyronino-philien Zellen nachweisbar (Abb. 10).

Abb. 10: Histologisches Präparat einer Hundeniere.

Zustand bei Transplantatnephrektomie am 7. Tag post transplantationem.

Färbung: HE; Vergrößerung: 25 x 100



Dabei handelt es sich nach dem lichtmikroskopischen Eindruck überwiegend um Lymphozyten, aktivierte Lymphozyten und Lymphoblasten. Etwa 25 % der Infiltrate bestanden aus plasmazytoiden Zellen und Plasmazellen.

In den Bereichen besonders dichter Zellinfiltration fanden sich häufig auch herdförmige Tubulusnekrosen mit dichter Durchsetzung durch zahlreiche neutrophile Granulozyten. Die Tubulusepithelien waren häufig degenerativ verändert und ab-

schnittweise fanden sich Tubulusepithelnekrosen.

In den Glomeruli waren die Endothel- und die Epithelzellen z. T. geschwollen und proliferiert, die Schlingen gelegentlich kollabiert.

Die beschriebenen Zellinfiltrate waren zum Teil perivaskulär deutlich akzentuiert.

Zellinfiltrate, die den im Parenchym beschriebenen entsprachen, fanden sich gelegentlich auch im Fettgewebe des Nierenhilus und in der Nierenbeckenschleimhaut.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Nieren das Bild einer mittelschweren bis schweren zellulären Transplantatreaktion zeigten.

5. Ergebnisse der Lymphozytenseparation aus abgestoßenen Nieren:

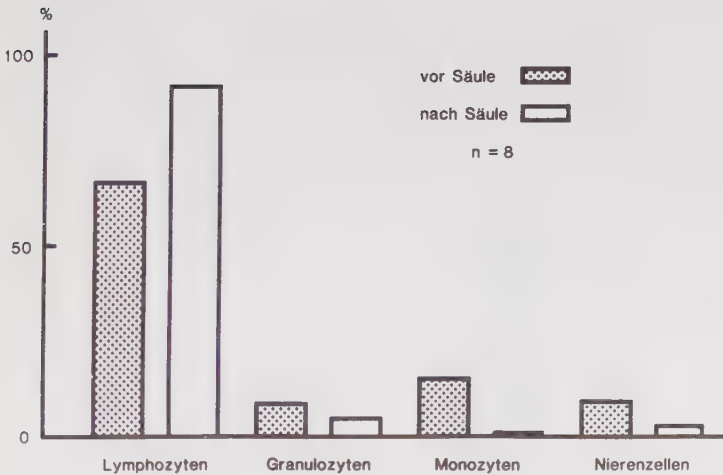
Die Separationsschritte, die der Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule vorangingen, lieferten eine Zellsuspension, die 67 ± 2 % Lymphozyten, 9 ± 4 % Granulozyten, 15 ± 2 % Monozyten und 9 ± 4 % Nierenzellen enthielt (Abb. 11) und war damit noch zu 33 % mit unerwünschten Zellen kontaminiert.

Pro Säule wurden 20×10^6 Zellen eingesetzt. Gearbeitet wurde mit 6 Säulen der gleichen Art.

Nach Eluation aller Säulen wurde ein Eluat erhalten, das 92 ± 4 % Lymphozyten, 5 ± 2 % Granulozyten, $0,75 \pm 0,70$ % Monozyten und $2,90 \pm 2,80$ % Nierenzellen enthielt.

Das Eluat enthielt also außer Lymphozyten nur noch 8 % andere Zellen, d. h. die Lymphozytenreinheit der Zellsuspension konnte von 67 % auf 92 % gesteigert werden.

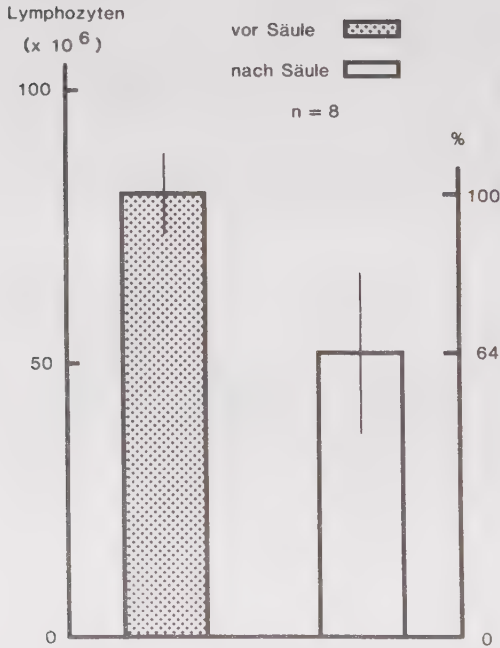
Abb. 11: Zellgehalt der Nierensuspension vor und nach Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule



Die Lymphozytengesamtausbeute betrug $52 \pm 15 \times 10^6$ mit der höchsten Vitalität von $91 \pm 2,6$ %. Umgerechnet auf ein Gramm aufgearbeitetes Nierengewebe, bedeutet dies, daß pro Gramm $0,37 \times 10^6$ Lymphozyten isoliert werden konnten.

Da insgesamt 120×10^6 Zellen in die Säulen eingesetzt wurden, von diesen aber nur 67,375 % oder $80,85 \pm 7,4 \times 10^6$ Lymphozyten waren, betrug die Lymphozytenwiedergewinnrate $64,2 \pm 16,6$ %, legt man die Lymphozytengesamtausbeute von $52 \pm 15 \times 10^6$ zugrunde (Abb. 12).

Abb. 12: Lymphozytenzahl vor und nach Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule



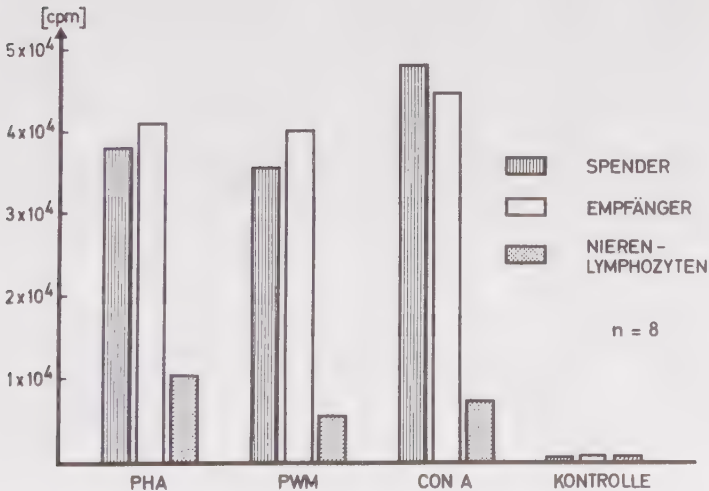
Durch die Säulenseparation konnte also der relative Lymphozytenanteil der Zellsuspension gesteigert werden, jedoch zu Lasten der absoluten Lymphozytenzahl, d. h., daß durch die Säulen $28,85 \times 10^6$ oder 36 % der eingesetzten Lymphozyten verloren gingen.

6. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen:

I. Mitogenstimulationsteste:

Die in-vitro-Stimulation von peripheren Spender- und Empfängerlymphozyten durch Mitogene (PHA, PWM, ConA) wiesen fast identische Werte auf und stimmten mit den präoperativ gemessenen Zählraten nahezu überein (Abb. 13).

Abb. 13: Stimulation von peripheren Spender- und Empfängerlymphozyten und von Niereninfiltratlymphozyten durch Mitogene



Die Stimulationsraten der in die Tests eingesetzten Lymphozyten aus abgestoßenen Transplantatnieren liegen bei allen drei Mitogenstimulationen signifikant unter denen der peripheren Lymphozyten.

Die Nierenlymphozyten zeigten, verglichen mit den peripheren Lymphozyten des Empfängers, durch PHA 75 %, durch PWM 86 % und Con A 83 % weniger proliferative Aktivität.

Dabei wurden die Lymphozyten, die aus der Niere separiert worden waren, durch PHA und ConA besser stimuliert, als durch PWM.

II. Gemischte Lymphozytenkultur (MLC):

Die MLC zeigte folgendes Bild:

Tab. 6: "Gemischte Lymphozytenkultur" von peripheren Spender- und Empfängerlymphozyten und Niereninfiltratlymphozyten

			Vor TP (cpm. $\pm$ s_x)	Nach Transplantatentnahme (cpm. $\pm$ s_x)
SpL	+	EL _x	15 490 $\pm$ 1 922	19 920 $\pm$ 2 480
SpL	+	NL _x		14 702 $\pm$ 1 819
SpL	+	SpL _x	701 $\pm$ 178	609 $\pm$ 182
EL	+	SpL _x	18 305 $\pm$ 1 857	17 850 $\pm$ 2 815
EL	+	NL _x		1 063 $\pm$ 189
EL	+	EL _x	688 $\pm$ 210	598 $\pm$ 155
NL	+	EL _x		812 $\pm$ 129
NL	+	SpL _x		8 223 $\pm$ 992
NL	+	NL _x		519 $\pm$ 113

SpL = Spenderlymphozyten, EL = Empfängerlymphozyten
 NL = Nierenlymphozyten, x = bestrahlt mit 2000 rad
 cpm = counts per minute, s_x = Standardabweichung

Periphere Spender- und Empfängerlymphozyten stimulieren sich gegenseitig gut (19 920 bzw. 17 850 counts/min), was auch in diesem Fall gut mit den Werten korreliert, die vor Transplantation (TP) gemessen wurden.

Stimuliert man periphere Spenderlymphozyten hingegen mit Nierenlymphozyten, so stimulieren diese um 26 % weniger als die peripheren Empfängerlymphozyten vom gleichen Tag.

Durch Nierenlymphozyten werden die peripheren Empfängerlymphozyten um 94 % schlechter stimuliert, als durch periphere Spenderlymphozyten, was deshalb verständlich erscheint, da es sich ja vor allem um Lymphozyten des Empfängers handelt.

Die proliferative Antwort der Nierenlymphozyten liegt um 54 % unter der der peripheren Empfängerlymphozyten, setzt man beide einem antigenen Stimulus in Form der peripheren Spenderlymphozyten aus.

III. Suppressor-Helferzell-Assay:

Stimuliert man periphere Empfängerlymphozyten mit allogenen bestrahlten Spenderlymphozyten und fügt diesem Testansatz noch bestrahlte Nierenlymphozyten hinzu, so resultiert eine der Transplantation entsprechende DLA-spezifische* Suppression der MLC von 60 % (Tab. 7).

Tab. 7: "Suppressor-Helferzell-Assay" mit peripheren Spender- und Empfängerlymphozyten und Niereninfiltratlymphozyten

Suppressor - Helferzell - Assay					Vor TP (cpm. $\pm$ s _x)	Nach Transplantatentnahme (cpm. $\pm$ s _x)	Suppression
EL	+	SpL _x	+	EL _x	12 574 $\pm$ 1 603	10 738 $\pm$ 1 064	60%
EL	+	SpL _x	+	NL _x		4 255 $\pm$ 1 362	
SpL	+	EL _x	+	SpL _x	13 507 $\pm$ 865	12 208 $\pm$ 1 374	40%
SpL	+	EL _x	+	NL _x		7 325 $\pm$ 1 680	

SpL = Spenderlymphozyten, EL = Empfängerlymphozyten
 NL = Nierenlymphozyten, x = bestrahlt mit 2000 rad
 cpm = counts per minute, s_x = Standardabweichung

* DLA = "Dog Lymphocyte Antigen"

Untersucht man die DLA-unspezifische suppressive Potenz der Niereninfiltratlymphozyten im Falle der allo-genen Stimulation des Spenders durch den Empfänger, so supprimieren die Nierenlymphozyten die Proliferation der Spenderlymphozyten um 40 %.

IV. Immunfluoreszenzmikroskopie:

Bei fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der separierten Nierenlymphozyten auf Subpopulationen zeigte sich, daß der Anteil der fluoreszierenden Zellen (= B-Lymphozyten) $7,75 \pm 2,30$ % betrug und damit die gewonnenen Lymphozyten zu 92 % aus T-Lymphozyten bzw. IgG-negativen Zellen bestanden.

Vor Einsatz der Zellsuspension in die Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule betrug der Anteil der T-Zellen 91 %, so daß durch die Säulenseparation das T- zu B-Lymphozytenverhältnis praktisch nicht verändert wurde.

7. Ergebnisse der Lymphozytenseparation aus einer humanen Transplantatniere:

I. Klinisch relevante Daten:

Es handelte sich um die Niere eines 45-jährigen Patienten männlichen Geschlechts, dem am Transplantationszentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München eine allogene Niere implantiert wurde, die 112 Tage nach Transplantation und nach 2 beherrschbaren Abstoßungskrisen bei der 3. Krise explantiert werden mußte. Die Indikation zur Explantation war durch rezidivierende, therapieresistente Fieberattacken, Funktionsverlust der Niere und eine vergrößerte, druckdolente Niere gegeben.

Der Serum-Kreatininwert bei Explantation betrug $841 \mu\text{mol/l}$. Direkt nach Transplantation erhielt der Patient für 10 Tage $1,3 \text{ g}$ Antilymphozytenglobulin (ALG)* pro Tag und

* Pressimmun, Antilymphozyten-Globuline aus Immunserum vom Pferd;
Behringwerke AG, Marburg/Lahn

2 Monate vor Explantation das letzte Mal für 9 Tage
2,6 g ALG/die.

Außerdem wurde die Abstoßungsreaktion mit Methylpred-
nisolon* und Azathioprin** therapiert.

Die Histologie der Niere zeigte eine schwer geschä-
digte Transplantatniere mit hochgradiger chronischer
obliterierender Transplantatvaskulopathie, sowie eine
mäßiggradige zelluläre Transplantatreaktion.

II. Zellausbeute:

Das perfundierte Explantat hatte ein Naßgewicht von
250 Gramm. Zum Zwecke der Zellseparation wurden 200
Gramm der Niere verwendet.

Die Aufarbeitung der Niere mit der beschriebenen Metho-
de erbrachte eine Lymphozytenausbeute von 110×10^6 ,
mit einer Vitalität von 95 %.

Das entspricht einem Lymphozytengewinn von $0,55 \times 10^6$
pro Gramm Nierengewebe (Tab. 8).

Wie aus Tab. 8 zu entnehmen ist, konnten aus der mensch-
lichen Niere 43 % mehr Lymphozyten isoliert werden, als
aus den Hundenieren, bezieht man die Lymphozytenausbeute
auf das Gewicht der aufgearbeiteten Niere.

Tab. 8: Lymphozytenausbeute der Humanniere, verglichen mit der
aus Hundenieren

	Nierengewicht (Gramm)	Lymphozyten ($\times 10^6$)	Lymphozyten / Gramm Nierengewebe ($\times 10^6$)	
Hunde-Nieren (n= 8)	141 $\pm$ 57	52 $\pm$ 15	0,385 $\pm$ 0,085	100 %
Human-Niere (n= 1)	200	110	0,550	143 %

* Urbason, Hoechst AG, Frankfurt/M.

** Imurek, Deutsche Wellcome GmbH, Burgwedel

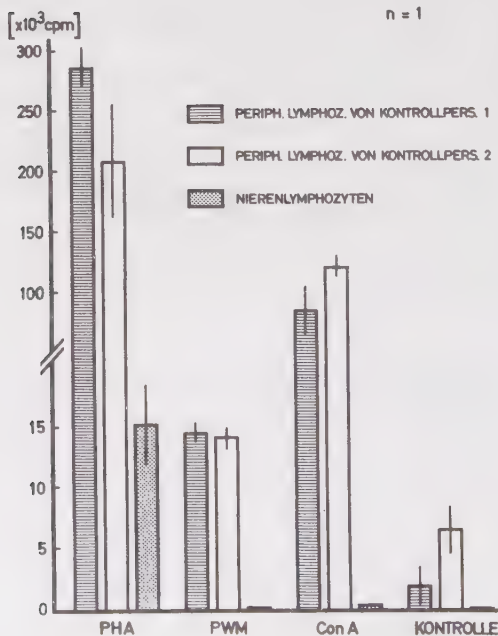
III. Immunologische Untersuchung der Lymphozyten in verschiedenen Testsystemen:

a) Mitogenstimulationsteste:

Bei Stimulation der Nierenlymphozyten durch PHA wiesen diese 5 % bzw. 7 % der Stimulierungsfähigkeit peripherer Lymphozyten von 2 gesunden Kontrollpersonen (K_1 und K_2) auf.

Mit PWM und ConA waren sie überhaupt nicht zu stimulieren (Abb. 14).

Abb. 14: Mitogenstimulationsteste von peripheren Kontroll-Lymphozyten und Niereninfiltratlymphozyten, isoliert aus einer menschlichen Niere



Die Niereninfiltratlymphozyten der lange Zeit funktionierenden (ca. 100 Tage), immunsupprimierten und irreversibel abgestoßenen Niere, waren also, im Vergleich zu Lymphozyten des peripheren Blutes von Kontrollpersonen durch PHA schlechter zur Proliferation anzuregen. Dies war ausgeprägter als bei den Hunden.

b) "Gemischte Lymphozytenkultur" (MLC):

In der "Gemischten Lymphozytenkultur" stimulieren die Nierenlymphozyten die peripheren Lymphozyten der Kontrollpersonen (K) schlechter als diese sich gegenseitig (Tab. 9).

Tab. 9: "Gemischte Lymphozytenkultur" von peripheren Kontroll-Lymphozyten und Niereninfiltratlymphozyten, isoliert aus einer menschlichen Niere

MLC	cpm
$K_1 + N_x$	25557 ± 3082
$K_2 + N_x$	7661 ± 3743
$N + K_{1x}$	1866 ± 715
$N + K_{2x}$	2342 ± 437
$K_1 + K_{2x}$	127161 ± 8263
$K_2 + K_{1x}$	83916 ± 8660

K = Kontrollpersonen

N = Lymphozyten aus einer menschl.

Niere separiert

K_1 wurde durch Niereninfiltratlymphozyten um 80 % weniger als durch K_2 und K_2 um 91 % weniger als durch K_1 stimuliert.

Die Nierenlymphozyten waren durch die Kontroll-Lymphozyten schlechter zur Proliferation anzuregen als diese durch Nierenlymphozyten.

c) Suppressor-Helferzell-Assay:

Im Suppressor-Helferzell-Assay supprimierten die mit 2000 rad bestrahlten Niereninfiltratlymphozyten HLA-un-spezifisch die gegenseitige Stimulation der Kontrollpersonen K_1 und K_2 um 13 % bzw. 25 % (Tab. 10).

Tab. 10: "Suppressor-Helferzell-Assay" von peripheren Kontroll-Lymphozyten und Niereninfiltratlymphozyten, isoliert aus einer menschlichen Niere

	cpm	%	Suppression
$K_2 + K_{1x} + K_{2x}$	73826 ± 6671	100	13 %
$K_2 + K_{1x} + N_x$	64422 ± 2774	87	
$K_1 + K_{2x} + K_{1x}$	116086 ± 3018	100	25 %
$K_1 + K_{2x} + N_x$	87155 ± 2550	75	

K = Kontrollperson

N = Lymphozyten aus einer menschl. Niere
separiert

d) Immunfluoreszenzmikroskopie:

Die immunfluoreszenzmikroskopische Beurteilung der separierten Lymphozyten ergab nur 2 % fluoreszierende Zellen bzw. B-Lymphozyten. Der T-Lymphozytenanteil war somit auf 98 % zu beziffern.

Außerdem wurden die Nierenlymphozyten mit FITC-markiertem Antihuman-Lymphozyten-IgG inkubiert, um zu prüfen, wieviele der Zellen ALG-positiv waren.

Es zeigte sich, daß wie im peripheren Blut 40 % der Zellen fluoreszierten und damit noch ALG-sensibel waren, d. h. Antigene auf ihrer Oberfläche trugen, an denen ALG funktionell ansetzt.

e) Lymphozytotoxischer Test:

In einem weiteren Testansatz wurde ein "Lymphozytotoxischer Test" durchgeführt, indem Verdünnungsreihen von ALG hergestellt wurden und diesen Nierenlymphozyten zugegeben wurden. Ermittelt wurde der Titer, bei dem sich bei Trypan-Blau-Färbung die Hälfte der Lymphozyten als nicht vital darstellten.

Es zeigte sich, daß bei einem Titer von 1 : 128 sowohl die Hälfte der Niereninfiltratlymphozyten als auch die Hälfte der Lymphozyten einer ALG-unbehandelten Kontrollperson abgetötet wurden.

Das bedeutet, daß die in die Niere eingewanderten Lymphozyten trotz vorangegangener hochdosierter ALG-Therapie immer noch ALG-sensibel, d.h. nicht therapieresistent waren.

D DISKUSSION

1) Diskussion der Methodik:

I. Kriterien zur Beurteilung akuter Abstoßungsreaktionen:

a) Klinische Anzeichen:

Die klinischen Merkmale einer Abstoßungsreaktion sind sowohl auf die eingeschränkte Nierenfunktion, als auch auf systemische Auswirkungen der Abstoßung zurückzuführen.

Beim Menschen stehen folgende Symptome im Vordergrund: Der Patient klagt über Schmerzen, Spannungsgefühl und Schwellung im Transplantatbereich, auf der Operationsseite macht sich beim Mann ein Anschwellen der Hoden, des Skrotums, sowie der Beine bemerkbar. Ein allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber, Blutdruckanstieg und Oligurie müssen an eine Abstoßungsreaktion denken lassen (52, 66). Auch psychische Alterationen wie Angst und Depression stellen häufige Symptome dar, unter denen die Patienten leiden (177).

Bei Tieren kann nur ein Teil der genannten Symptome zur Diagnose einer Abstoßungsreaktion herangezogen werden; - Anzeichen wie Blutdruckerhöhung, Schmerzen, Spannungsgefühl und psychische Veränderungen mußten aufgrund allzu aufwendiger Diagnostik bzw. schlechter Objektivierbarkeit außer acht gelassen werden.

b) Laborbefunde:

Der Anstieg der Serumwerte für Kreatinin, Harnstoff und Kalium, sowie die ausgeprägte Leukozytose stehen gut in Einklang mit den Ergebnissen, die J. P. Merrill 1971 (166) veröffentlichte. Er berichtet über eine Linksverschiebung der Granulozyten.

Eine Thrombozytopenie (166) war nicht in jedem Fall zu diagnostizieren - die starken Schwankungen der Thrombozyten sind eventuell darauf zurückzuführen, daß nicht jedes Tier Thrombozytenaggregationen und somit eine Thrombozytopenie zeigt (85).

Man kann also davon ausgehen, daß die Laborbefunde zusammen mit den klinischen Symptomen meist zur Diagnose der Transplantatabstoßung ausreichen.

Unter klinischen Bedingungen schaffen immunologisches Monitoring (240) und eine histologische Untersuchung der Niere weitere Klarheit.

c) Histologische Untersuchungen:

Bei histologischen Untersuchungen der Nieren, die einer akuten Abstoßungsreaktion unterliegen, lassen sich folgende Veränderungen unterscheiden:

1. Zelluläre Infiltration: Innerhalb der ersten zwei Tage post transplantationem treten in der Nierenrinde und im äußeren Mark nacheinander kleine Lymphozyten, große undifferenzierte Lymphozyten, Plasmazellen, plasmazytoide Zellen und Makrophagen auf. Auch neutrophile Granulozyten werden gefunden (7, 13, 198).
2. Akute Vaskulitis: Endotheliale Zellschwellungen und zelluläre Infiltrationen treten an der lumenwärtigen Endothelseite auf. Dabei bilden mononukleäre Zellen mit den vaskulären Endothelzellen eine zytoplasmatische Einheit (124, 198, 267). Es kommt zur fokalen fibrinoiden Nekrose der Gefäßwände und im Lumen zu Ablagerungen von Fibrin, Thrombozyten, pyroninophilen Zellen und lymphoiden Zellen. Alle diese Veränderungen finden im Laufe der ersten Woche nach der Transplantation statt und sind in den arteriellen Gefäßen wesentlich stärker ausgeprägt als in den venösen (77, 124, 267).
3. Interstitielles Ödem: Das Ödem entsteht vom 3. Tag post transplantationem an. Endothelzellen der Blutgefäße runden sich ab und werden so voneinander getrennt. Auf diese Weise kann Flüssigkeit aus den Gefäßen austreten (198).

4. Tubuläre Atrophie und herdförmige Nekrose mit Infiltration der Tubuluswand (77, 124): Hier werden die proximalen Tubuli zuerst betroffen (13).
5. Glomeruläre Veränderungen: sind verbunden mit Verdickungen der kapillären Basalmembran (124).

Nach J. M. Corson (46) ergeben sich also bei einer akuten Abstoßungsreaktion folgende charakteristischen Befunde: Interstitielle Nephritis in Verbindung mit Glomerulitis und Arteriitis - in schweren Fällen sogar eine Pannephritis.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Zellinfiltrationen und den Veränderungen an den Tubuli, Glomerula und Endothelzellen in unseren Präparaten überein. Da weder Laborbefunde noch klinische Erscheinungen allein ausschlaggebend für die Diagnose der akuten Abstoßung sind, war es uns auf diese Weise möglich, einen entscheidenden Beweis für das Vorhandensein einer derartigen Reaktion bei Explantation der Nieren zu liefern.

II. Die Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule im Vergleich zu anderen Methoden der Lymphozyten-Separation:

Wie bei der Beschreibung der histologischen Befunde ausgeführt, werden Allotransplantate während der akuten Abstoßungskrise von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Blasten) (163, 225) und vor allem in den nekrotischen Teilen auch von Granulozyten infiltriert (225).

Da insbesondere die Lymphozyten im Zusammenhang mit der Transplantatabstoßung als Regulatoren in dieser Kette von Reaktionen angesehen werden, ist es von besonderem Interesse, diese Zellen aus der heterogenen

Zellpopulation der Infiltratzellen zu isolieren und so eine möglichst homogene Population zu erhalten.

Erst mit diesen separierten Zelltypen ist es möglich, die Zellen auf Grund ihrer Funktion zu charakterisieren und ihre Interaktionen zu erforschen.

Es besteht eine große Informationslücke über diese Infiltratzellen. Der Grund hierfür ist die Schwierigkeit, aus abgestoßenen Allotransplantaten eine genügend große Anzahl Infiltratzellen lebend zu isolieren. Auf Grund der Komplexität des Zellgemisches ist es sehr schwierig, mit einer einzelnen Methode die Separation aller Zellklassen zu erreichen.

Nur die Kombination verschiedener Methoden kann das gewünschte Ergebnis bringen.

Will man Lymphozyten aus einem Organ, das eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen enthält, isolieren, so ist man gezwungen, sich zunächst an Methoden zu orientieren, die Lymphozyten aus peripherem Blut oder lymphoiden Organen, wie Lymphknoten oder Milz, zu separieren. Prinzipiell zielen alle Methoden darauf ab, entweder die erwünschten Zellen dadurch zu isolieren, daß man die kontaminierenden Zellen zerstört oder aus der Zellsuspension entfernt. Man kann aber auch umgekehrt verfahren und die Zellpopulation, die man separieren will, aus der Zellsuspension isolieren und die unerwünschten Zellen zurücklassen.

Die Verfahren, die hierfür Verwendung finden, kann man vereinfacht folgendermaßen aufgliedern:

Zellisolation nach-

- a) der Größe
- b) dem spezifischen Gewicht
- c) der Sedimentationsgeschwindigkeit
- d) Oberflächeneigenschaften der Zelle.

ad a):

Bei der Separation nach der Zellgröße finden vor allem Siebe und Filter verschiedenster Zusammensetzung Verwendung. Hierbei ist die Größe der zurückgehaltenen bzw. filtrierbaren Zellelemente primär durch die durchschnittliche Porengröße bedingt, sekundär aber auch durch die Form und die mechanische Flexibilität der Zelle, das Filtermaterial und den Filtrierdruck determiniert.

Als Filter haben heute hauptsächlich Zellulose- und Polycarbonat-Membranfilter in die klinische Routine Eingang gefunden (215, 217).

ad b):

Die Isolation von Zellen nach ihrem spezifischen Gewicht beruht auf dem Prinzip, daß Zellen, die über eine Flüssigkeitssäule geschichtet werden, die einen von oben nach unten ansteigenden Dichtegradienten hat, soweit absinken, bis sie die Stelle im Gradienten erreicht haben, die ihrer eigenen Dichte entspricht (4).

Diese Technik der isopyknischen Sedimentation ist unabhängig von der Größe und Form der Zelle.

Als Gradientenmedium finden die verschiedensten Agentien Verwendung: Albumin (220, 222, 272), Dextran (23), Ficoll (11, 24, 154) und kolloidales Silica (216, 254).

Der Aufbau des Gradienten kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen.

ad c):

Zellseparation nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit nutzt die Tatsache aus, daß verschiedene Zelltypen, die über ein Medium bestimmter Dichte geschichtet werden, mit verschiedener Geschwindigkeit absedimentieren.

Dabei ist diese Sinkgeschwindigkeit eine Funktion der Zellgröße, der Dichte und der Form der Zellen, wobei die Größe der Zelle die wichtigste Komponente ist (165).

Trotzdem übt auch die Dichte der Zelle einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß aus, so daß es sein kann, daß Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten die gleichen Volumina haben und Zellen der gleichen Sedimentationsgeschwindigkeit sich in der Größe unterscheiden (168, 169, 175).

ad d):

Die Oberflächeneigenschaften von mononukleären Zellen bieten eine ganze Reihe von Möglichkeiten der Isolation bestimmter Zelltypen. Die meisten Methoden beruhen auf der Fähigkeit von Monozyten und Makrophagen zur Adhärenz an verschiedenen Oberflächen.

So finden Säulen aus Nylon-Wolle (92, 128, 148), Viskose-Wolle (138, 185), Baumwolle (144, 258) und Glaswolle (27) ebenso Verwendung, wie Adhärenz an Plastik- oder Glasplatten (140), Glas-Perlen (81, 201, 221) und Sephadex-Kügelchen (158).

Insbesondere an Nylonwolle-Säulen haften außer Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten aber auch Immunglobulin-tragende Zellen - also hauptsächlich B-Zellen (45, 128, 141, 148). Die Adhärenz von B-Lymphozyten ist ein aktiver Prozeß und als solcher temperaturabhängig (91).

Es wurden auch Methoden beschrieben, die Zellen dadurch zu isolieren, daß diese spezifisch über ihre Oberflächen-Rezeptoren oder -Antikörper an Glasperlen (264, 265), Sephadex (43, 230) oder sogenannte Mikrosphären (263) gebunden werden, nachdem an diese vorher spezifische Antigene oder Antikörper gekoppelt wurden.

Alle vorstehend aufgeführten Methoden finden bei der Lymphozytenseparation aus peripherem Blut (PB) oder lymphoiden Organen routinemäßig erfolgreichen Einsatz. Sie alle sind aber limitiert bei dem Versuch, mit ihrer Hilfe Zellen aus abgestoßenen Nieren zu isolieren.

Aus der Literatur sind nur einige wenige Arbeitsgruppen bekannt, die bisher versuchten, Zellen aus abgestoßenen Allo-Transplantaten zu isolieren (101, 242).

Strom (242) separierte mononukleäre Zellen aus einer menschlichen Niere, indem er sie nach mechanischer Disaggregation über Ficoll ($D = 1,077$) schickte, die Interphase abhob, mit DNase inkubierte und nach einem Waschvorgang nochmals über Ficoll zentrifugierte.

Häyry (101) behandelte Menschen- und Rattennieren, nachdem er sie in kleine Stückchen gewürfelt hatte, mit DNase/Collagenase und schichtete den resultierenden Gewebebrei über Human-Serum-Albumin-MEM-Gradienten und ließ die Zellen bei 1 g-Schwerkraft, entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit absinken.

Strom (242) beschreibt eine Ausbeute mononukleärer Zellen von $1,0 - 12,3 \times 10^5$ pro Gramm Nierengewebe, die allerdings noch mit 1 - 20 % Nierengewebe kontaminiert waren.

Eigene Vorversuche, die ebenfalls eine enzymatische Gewebeaufspaltung und Zentrifugation über Ficoll der Dichte 1,077 beinhalteten, ergaben nur eine Lymphozytenausbeute von $6,7 \times 10^6$, entsprechend $6,6 \times 10^4$ pro Gramm.

Ergebnisse mit anderen Ficolldichten ($D = 1,045 - 1,092$) waren noch schlechter ($4,75 \times 10^6$). Die Verunreinigung der gewonnenen Nierenzellen lag bei weit über 20 %.

Verantwortlich für diese geringe Zellausbeute waren in erster Linie noch vorhandene Nierenzellverbände und einzelne Parenchymzellen, die die disaggregierten Lymphozyten mit sich ins Pellet rissen. Zusätzlich beobachteten

wir eine nicht spezifische Adhärenz von Zellen in Form dichter Zellklumpen an den Wänden des Zentrifugenröhrchens.

Während Häyry (101) in seiner Arbeit über sehr hohe Zellausbeuten und Zellverluste nur in Höhe von 8 % berichtet, konnten wir durch Sedimentation von enzymvorbehandelten Zellsuspensionen in Dextran 250 000 (226) nur eine Lymphozytenausbeute von $2,8 \times 10^6$ Zellen erreichen. Auch hier lag der schlechteren Ausbeute die Tendenz zugrunde, Aggregate zu bilden und so schneller zu sedimentieren. Eine Adhärenz von Zellen an den Wänden des Röhrchens wurde in beträchtlichem Umfang festgestellt.

Wie bei der vorher besprochenen Methode war die resultierende Lymphozytenpräparation auch hier in nicht akzeptablem Umfang durch Nierenzellen und Zellkonglomerate - selbst nach anschließender Passage über Ficoll - verunreinigt.

Da die vorstehend aufgeführten Pilotversuche nicht die geforderten hohen Lymphozytenausbeuten erbrachten, modifizierten wir eine von C.B. Hansen (107) beschriebene Methode der Lymphozytenseparation, bis wir das hier beschriebene Verfahren zu einem reproduzierbaren Standard entwickelt hatten.

Diese Methode stellt eine Aneinanderreihung verschiedener Separationsschritte nach steigender Selektivität dar. Das Endziel der Isolation sind möglichst reine vitale Lymphozyten in einem guten Funktionszustand.

Der grundlegende Unterschied zu den oben aufgeführten Methoden besteht darin, daß wir nicht das gesamte Zellinfiltrat, sondern reine Lymphozyten separierten.

Jeder Schritt unserer Methode für sich allein ist nicht zur optimalen Lymphozytenseparation geeignet.

Nachdem die Niere, wie in unserer Methode beschrieben, mittels Passage durch Metallsiebe und enzymatische Disaggregation in Einzelzellen und kleinere und größere Zellverbände aufgespalten war, folgte die Filtration des Nierenhomogenisates durch ein Mikrofiltrationsgerät.

Dieser Reinigungsschritt war essentiell, da ohne diese Prozedur die Sephadex-G 10-Säulen, wie in Vorversuchen geprüft wurde, sehr schnell verstopfen.

Vor diesem Filtrationsschritt bestand die Nierensuspension noch aus einer heterogenen Population von mononukleären Zellen, die exzessiv mit Zellverbänden, Nierenparenchymzellen und Granulozyten kontaminiert war. Sinn der Mikrofiltration war es, diese unerwünschten zellulären Elemente durch Filtration bis in den 10 μ m-Bereich zu entfernen. Die Reduktion der Leukozyten durch den Filter ist, wie frühere Untersuchungen an Frischblut (58, 98) zeigten, unter 10 % und nicht selektiv.

Die Reduktion kontaminierender Zellen bis zu einem befriedigenden Ausmaß war gebunden an einen möglichst geringen Filtrierdruck und einen raschen Filterwechsel.

Das Mikrofiltrationsgerät ergab eine Zellsuspension, die schon zu 67 % aus Lymphozyten und 9 % Granulozyten, 15 % Monozyten und 9 % Nierenzellen bestand.

Die Kontamination betrug noch 33 % und genügte damit noch nicht dem nötigen hohen Reinheitsgrad der Lymphozyten.

Deshalb folgte noch als abschließender Separationsschritt die Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule.

Sie stellt eine Kombination von 2 Methoden (158) zur Isolation adhärenter mononukleärer Zellen (Monozyten, Makrophagen) aus der Zellsuspension dar:

- a) Adhärenz an Sephadex-G 10
- b) Adhärenz an Glasperlen

Die ursprünglich beschriebene Methode (158) mußte in einigen Punkten modifiziert werden.

So erwies es sich als sinnvoll, ein Sephadex-Volumen von 18 ml zu verwenden, um eine möglichst hohe Zellausbeute zu erreichen.

Sowohl ein größeres (107, 158), wie auch ein kleineres Säulenvolumen resultieren in erheblich geringeren Zellausbeuten, bzw. erhöhter Kontamination.

Auch das Glasperlengewicht reduzierten wir von 10 g auf 8 g.

Wichtig für das Gelingen der Separation war der Zusatz von foetalem Kälberserum (FCS) zum Waschmedium.

Während man zunächst der Meinung war, daß frisches Serum für eine gute Adhärenz insbesondere an Glasperlen wichtig sei (191, 201), zeigten andere, daß hitzeinaktiviertes Serum weit bessere Adhärenz bewirkt (99, 143).

Letztere vermuteten einen adhäsionshemmenden thermolabilen Faktor im nativen Serum. Die prozentuale Konzentration des inaktivierten FCS ist für die Adhärenz von Lymphozyten-Subpopulationen, insbesondere B-Zellen, verantwortlich.

Während Ly (158) mit 5 % inaktiviertem FCS einen fast vollständigen B-Lymphozyten-Verlust feststellte, zeigten andere, daß unter Verwendung von 20 % FCS das relative Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten unverändert bleibt (21, 126).

Wir verwendeten zur Eluation der Zellen 10 % inaktiviertes FCS und mußten damit keinen selektiven B-Zellverlust hinnehmen.

Vor Säule registrierten wir 91 %, nach Säule 92 % T-Lymphozyten, bzw. IgG-negative Lymphozyten. Bei Unter-

suchungen der Lymphozyten, die in der Säule verloren gehen, konnte bestätigt werden, daß diese Zellen in keiner Weise selektiert sind, sondern nach dem Zufallsprinzip hängen bleiben (126).

Neben der Adhärenz an den Sephadex- und Glaskügelchen spielt die Separation nach der Größe wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Zwar wurde beobachtet, daß bei Separation über Glasperlen 70 - 90 % der Lymphozyten in der Säule verloren gingen und nur Zellen mit einem Durchmesser kleiner als 10 μ m passierten (3), jedoch tritt ein solcher Effekt erst bei Glasperlen mit einem Durchmesser unter 100 μ m auf (221).

Wir benutzten Glaskügelchen, deren Durchmesser 0,25 - 0,30 mm war und konnten auch keine Lymphozytenfiltration nach der Größe feststellen. Nierenparenchymzellen, die größer als Lymphozyten sind, scheinen auf Grund ihrer Größe zurückgehalten zu werden. Sie wurden durch die Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule von 9 % auf 3 % reduziert. Die Vitalität der gewonnenen Lymphozyten war mit 91 % höher als bei der Methode nach Strom (242) - Häyry (101) gibt keine Vitalität an.

Die Sephadex-G 10-Glasperlen-Säule ergab eine Lymphozytengesamtausbeute von 52×10^6 Zellen, entsprechend $3,7 \times 10^5$ /Gramm Nierengewebe und diese lag damit in der Größenordnung, die Strom (242) beschrieben hatte. Die Lymphozytenreinheit betrug 92 %, das Verhältnis von T- zu B-Zellen wurde durch die Säulen-Fraktionierung nicht verändert, wie die Immunfluoreszenz mikroskopisch zeigte. Durch diesen Separationsschritt gelang es also, den Lymphozytenanteil nochmals um 25 % zu steigern.

Die Effizienz der Makrophagen- und Monozytenisolation war mit einer Abnahme dieser Zellen um 95 % beeindruckend. Vor Säule fanden sich noch 15 % Monozyten in der Zellsuspension, danach noch 0,75 %.

Bei Verwendung dieser Methode zur Entfernung von Monozyten aus peripherem Blut wird über vollständigen (21) oder fast gänzlichen (126) Ausschluß dieser Zellen berichtet. D.A. Lawrence (148) fand im peripheren Blut noch 5 % Monozyten, nachdem er es, nach Inkubation auf einer Glasoberfläche, über eine Sephadex-G 10-Glasperlen-Säulen laufen ließ.

Der nicht selektive Lymphozytenverlust in der Säule ist bei uns mit 36 % höher als bei Hansen und Berliner (21), steht jedoch gut in Einklang mit dem Zellgewinn von Jerrells (126), bei dem 71 % der Lymphozyten eine reine Sephadex-G 10-Säule passierten.

Ly (158) berichtete über Lymphozyten-Wiedergewinnraten von nur 30 - 40 %.

Andere theoretisch denkbare Methoden der Makrophagen/Monozyten-Entfernung, wie Passage über Nylon-Wolle oder Kunstseide waren aus verschiedenen Gründen nicht sinnvoll.

So ist von Nylon-Wolle-Säulen bekannt, daß sie in beträchtlichem Umfang B-Lymphozyten binden (91, 128), die biochemische Membranzusammensetzung verändern (Verlust von Cholesterol und Phospholipiden) (45) und daß die Membranpermeabilität für Lysozym gesteigert wird (270).

Kunstseide-Säulen verändern zwar das T- und B-Lymphozyten-Verhältnis nicht in diesem Umfang (185), jedoch haben sie mit den Nylon-Wolle-Säulen den entscheidenden Nachteil gemeinsam, daß sie nur eine niedrige Lymphozytenausbeute von 25 - 35 % erreichen (126).

Die hier vorgestellte Methode der Lymphozytenseparation mittels Sephadex-G 10-Glasperlen-Säulen war also in der Lage, aus einer abgestoßenen Allo-Transplantatniere eine

hochgereinigte, vitale und sterile Lymphozytenpopulation, deren Subklassen-Verhältnis unverändert war, zu separieren.

Nur mittels einer derartigen gereinigten Population konnten wir die im folgenden dargestellten Funktionsuntersuchungen durchführen.

III. Besprechung der immunologischen Methoden:

An dieser Stelle soll kurz erläutert werden, welche grundsätzlichen Fähigkeiten diese Methoden haben und welche Aussagen mit ihrer Hilfe getroffen werden können.

a) Immunfluoreszenzmikroskopie:

Hierbei werden die Immunglobuline (Ig), die mit ihrem Fab-Fragment aus der Zelloberfläche herausragen, mit einem fluoreszierenden Anti-Antikörper markiert (200, 203). Da nur B-Lymphozyten Oberflächen-Ig in solcher Dichte tragen, gelingt durch diese Methode ihre eindeutige Identifizierung.

T-Lymphozyten tragen kein Ig (43) und werden somit nicht markiert.

Dieses Oberflächen-Ig darf nicht mit den Rezeptoren für den Fc-Anteil von Immunglobulin, das mit Antigen einen Antigen-Antikörper-Komplex gebildet hat, verwechselt werden. Zellen, die diese Rezeptoren tragen, sind ebenfalls hauptsächlich B-Lymphozyten und sie werden durch Rosettenbildung mit Erythrozyten nachgewiesen (265).

b) Mitogenstimulationsteste:

Durch die Phytomitogene PHA, PWM und ConA werden Lymphozyten (113) zur Proliferation angeregt.

Dabei stimulieren die einzelnen Mitogene Subpopulationen von Lymphozyten unterschiedlich.

Während man zunächst glaubte, PHA stimulierte unspezifisch alle Lymphozyten (48), neigt man heute mehr zu der Ansicht, daß PHA selektiv die T-Lymphozyten polyklonal (22) zur DNS-Synthese und damit zur Zellteilung anregt.

Durch PHA wird also bevorzugt der T-Zell-Anteil der Kultur expandiert (31, 79, 180). Es wird über eine Stimulationsrate von 85 % T-Lymphozyten berichtet (53),

was ungefähr dem durchschnittlichen T-Zell-Anteil im peripheren Blut entspricht.

Proliferation von B-Lymphozyten (67) tritt in nennenswertem Umfang nur bei niedrigen (0,1 µg/ml) Konzentrationen von PHA auf.

In diesem Fall kommt es zur sekundären polyklonalen B-Lymphozyten-Aktivierung (22) - wahrscheinlich durch sekundäre T-abhängige Sekretion von polyklonalen Mediatoren, ähnlich dem LMF (lymphocyte mitogenic factor) (82).

Dieses Phänomen tritt in einem schmalen Dosis-Wirkungsbereich auf und kann bei der von uns verwendeten PHA-Konzentration von 1 µg/ml vernachlässigt werden.

Die Stimulation von B-Lymphozyten ist also ein sekundäres Ereignis und an die Anwesenheit aktivierter T-Lymphozyten, die als Helfer-Zellen fungieren, gebunden (22, 54).

Nanra (180) berichtet über eine signifikante Korrelation ($P < 0,05$) zwischen der Reaktion der T-Lymphozyten nach PHA-Applikation und der Proliferation von T-Zellen in der MLC.

Opelz und Terasaki (186) berichten über eine Assoziation vom MLC-Reaktivität und TP-Abstoßung. Andere wiesen eine Korrelation zwischen Transplantatfunktion und T-Lymphozyten-Antwort des Empfängers nach PHA-Gabe nach (246).

Dwyer et al. (65) zeigten, daß post transplantationem Abstoßungskrisen vorhergesagt werden können, wenn die Empfänger-T-Lymphozyten einerseits auf PHA und andererseits auf gepoolte allogene bestrahlte Lymphozyten mit verstärkter Proliferation reagieren. Die Effektivität dieses immunologischen Monitorings wurde von anderen in Frage gestellt (231, 240).

Da eine direkte Beziehung zwischen der Anzahl der OKT 3-positiven Lymphozyten (reife T-Zellen) und der Reaktion auf PHA besteht, d. h. bei guter Stimulierbarkeit sind viele OKT 3-positive Zellen feststellbar (14), ist Proliferation nach PHA-Inkubation ein guter Parameter, um den Funktionszustand der T-Lymphozyten zu überprüfen.

Besonders die T-Helfer-Zellen werden durch PHA maximal zur Zellteilung angeregt (206), während zytotoxische Lymphozyten und Suppressor-Zellen weniger proliferieren.

Das oben Gesagte gilt entsprechend für ConA, mit dem Unterschied, daß durch dieses Lektin sowohl T-Helfer-, als auch zytotoxische und suppressiv wirkende T-Lymphozyten in gleichem Umfang stimuliert werden (206).

Inkubiert man Lymphozyten mit ConA, so kommt es zur Aktivierung von Suppressor-T-Zellen, die in der Lage sind, die normale Immunantwort auf Mitogene, Antigene und allogene Zellen zu supprimieren (153, 223).

Bei der Stimulation von Lymphozyten mit PWM kommt es zur gleichstarken Aktivierung sowohl von T-, als auch von B-Zellen, wobei deren relatives Verhältnis auch bei längerer Kulturzeit nicht verändert wird (22, 104). Dabei kommt es zur polyklonalen B-Zell-Aktivierung, die T-abhängig ist, d.h. T-Helfer-Zellen benötigt (110, 183, 184).

Die beste Stimulation erreicht man mit einer gleichen Anzahl von T- und B-Lymphozyten im Testansatz (136). Separiert man T-Zellen, bestrahlt sie und mischt diese dann im gleichen Verhältnis mit B-Lymphozyten, so ist eine wesentlich stärkere Proliferation meßbar als unter Verwendung unbestrahlter T-Zellen (74).

Es scheint also so zu sein, daß die B-Lymphozyten-Aktivierung in diesem System durch strahlensensible Suppressor-T-Zellen reguliert wird und es durch die Bestrahlung zu einem Überwiegen der Helfer-Lymphozyten kommt (137).

Da die B-Zell-Stimulierung durch Antigen in vivo ähnlichen Regulationsmechanismen unterliegt, benützt man PWM konsequenterweise, um die Reaktivität von Lymphozyten-Subpopulationen in vitro zu prüfen.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß die Stimulationsrate von Lymphozyten, angeregt durch PHA, PWM oder ConA, ein Maß für die funktionelle Integrität, den Subklassenanteil und die Helfer- bzw. Suppressor-Zell-Aktivität einer gegebenen Lymphozytenpopulation ist.

c) Gemischte Lymphozytenkultur (MLC):

Cokultiviert man Lymphozyten von zwei verschiedenen Individuen, so erkennen die "Responder"-Zellen die allo-genen HLA-D/DR-Determinanten auf der Zelloberfläche der Stimulatorzellen.

Dabei wird den "Responder"-Lymphozyten das Antigen entweder durch Makrophagen (19), vielleicht aber auch durch Ia-Antigen-positive dendritische Zellen, die als stark immunogen beschrieben werden (237), präsentiert. Lowry (156) betrachtet die dendritischen Zellen, denen auch als Passenger-Zellen im Transplantat eine wichtige Initiatorrolle zugeschrieben wird (18), sogar als die Hauptstimulator-Zelle der MLC.

Nach Antigen-Präsentation kommt es unter DNS-Bildung zur Blastentransformation, gefolgt von T-Zellproliferation bzw. Bildung spezifisch zytotoxischer T-Lymphozyten (33, 40, 88).

Daß die spezifische zytotoxische Immunantwort von T-Lymphozyten getragen wird, konnte mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden (205). Hierfür spricht auch, daß zwar isolierte T-Lymphozyten in der MLC reagieren, jedoch B-Zellen allein keine Proliferation aufweisen (86, 256). Außerdem kommt es nur zu allogenen Reaktionen, wenn die "Responder"-Population T-Lymphozyten und die stimulierenden Zellen B-Lymphozyten enthalten.

Die stärksten Reaktionen in der MLC kann man beobachten, wenn man T-Lymphozyten mit bestrahlten B-Zellen kultiviert (260). Hieraus folgt, daß der T-Lymphozyt die "Responder"-Zelle und der B-Lymphozyt (- oder vorsichtig ausgedrückt ein Nicht-T-Lymphozyt-) die Stimulator-Zelle ist.

Außer T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten proliferieren in der MLC aber auch T-Suppressor-Zellen (251) und sogar B-Lymphozyten werden T-abhängig sekundär zur polyklonalen Proliferation angeregt (22). Das Maximum der B-Lymphozyten-Stimulation tritt allerdings erst zu einem Zeitpunkt auf (ca. 8.Tag), zu dem wir unsere MLC bereits "geerntet" haben. Somit spielt Aktivierung der B-Zellen in unserem Testsystem keine Rolle.

Die MLC kann als ein in vitro Modell für die allogene Transplantat-Abstoßung angesehen werden. Dabei stellt die Proliferation der "Responder"-Zellen den afferenten (die Sensibilisierungsphase) und die zytotoxische Effektorzelle den efferenten Schenkel der Transplantatantwort dar (100). Hamburger (103) konnte dies bestätigen, indem er die abführenden Lymphgefäße transplan- tierter Nieren kanülierte und die Lymphozytenveränderungen, die er hierbei feststellte, mit denen verglich, die zur gleichen Zeit in der MLC von peripheren Lymphozyten auftraten.

d) Suppressor-Helferzell-Assay:

Gershon und Kondo (83) waren die ersten, denen auffiel, daß spezifische immunologische Toleranz durch T-Lymphozyten übertragen werden kann.

Sie postulierten deshalb die Existenz einer Suppressorzelle. Seit dieser Zeit ist die Rolle der immunregulativ wirkenden T-Zellen immer mehr in den Blickpunkt des Interesses getreten und wurde diese heterogene Population intensiv untersucht.

So wurden außer den Suppressorzellen der Antikörper-Synthese (22, 63, 83) solche beschrieben, die in der Lage sind, zellvermittelte Immunantworten wie "Graft-versus-host"-Reaktionen (111), verzögerte Überempfindlichkeitsreaktionen (133, 193), MLC (41, 208), proliferative Reaktion auf Mitogene (76, 223) und zellvermittelte Zytotoxizität (49, 50, 120) zu supprimieren.

Obwohl auch schon B-Lymphozyten (133, 181) und selbst Makrophagen (147, 185, 269) als Suppressorzellen beschrieben wurden, ist man sich heute einig, daß die zentrale "Steuerzelle" in der Immunregulation eine OKT 8-positive T-Suppressorzelle ist (206). Sie steht in Kommunikation mit Helferzellen, die meist ebenfalls T-Zellen (129), aber auch B-Zellen (131, 227) und Makrophagen (255) sein können.

Die Helfer- und Suppressorzellen sind die regulativen Elemente der Immunantwort (36). Sie stehen unter normalen Bedingungen in einem ausbalanzierten Gleichgewicht miteinander. Helferzell- und Suppressor-Tonus verhalten sich umgekehrt proportional zueinander, d. h. Anstieg des einen Tonus ist von einem konsekutiven Abfall des anderen begleitet.

Wahrscheinlich üben Suppressorzellen durch Sekretion löslicher Suppressorfaktoren ihre inhibierende Wirkung aus (20, 134, 147). Ihre Wirkung kann unspezifisch,

wie im Falle der ConA-aktivierten Suppressorzellen (189, 199) oder spezifisch sein, nach Aktivierung mit Antigen (9, 42). Eventuell beruht die spezifische und die unspezifische Suppression auf der Bildung von zwei verschiedenen Suppressor-Faktoren (20, 114).

Durch ConA polyklonal aktivierte Suppressor-T-Zellen hemmen unspezifisch sowohl humoral (115) als auch zellulär (223) vermittelte Immunreaktionen.

Zusätzlich ist bekannt, daß Suppressor-T-Zellen, die im Verlauf einer Abstoßungsreaktion als Antwort auf die Alloaktivierung gebildet werden, sowohl die MLC, im in vitro Modell (84, 119, 207), als auch die Abstoßung des Transplantates in vivo (135, 218) inhibieren.

Um zu prüfen, ob auch unsere Lymphozytenpräparation suppressive Aktivität enthielt, wurden isolierte, inaktivierte Infiltratzellen in den Suppressor-Helferzell-Assay eingebracht.

Hierbei handelt es sich, wie aus dem Testansatz ersichtlich, um eine MLC, der als "Third-party"-Zelle noch die potentiell suppressiv wirkenden Nierenlymphozyten bzw. periphere bestrahlte Empfängerlymphozyten beigelegt wurden.

Sind Suppressorzellen vorhanden, so ist ein verminderter ^3H -Thymidin-Einbau als Zeichen einer reduzierten Proliferation zu erwarten.

2) Diskussion der Ergebnisse:

I. Charakterisierung des Zellinfiltrates während der allogenen Transplantatabstoßung:

Im Zellinfiltrat einer abgestoßenen Niere werden Lymphozyten, Monozyten, Blasten, Makrophagen und Granulozyten gefunden, wobei lediglich die Granulozyten während des gesamten Beobachtungszeitraumes auftreten. Die anderen Subpopulationen erscheinen in der genannten Reihenfolge (101, 102).

a) Prozentuale Verteilung der Infiltratzellen:

Die Angaben über die prozentuale Zusammensetzung des Zellinfiltrates in abgestoßenen Nierentransplantaten divergieren sehr.

So werden für den Lymphozytenanteil Zahlen zwischen 24 % (69, 87, 242, 266) angegeben. Die Zahlen des Makrophagen-/Monozyten-Anteils streuen mit Angaben von ca. 10 % (69, 87, 242, 249) bis 45 % - 60 % (102, 106) ebenfalls über einen weiten Bereich.

Diese beträchtlichen Differenzen sind nur zu einem geringen Anteil durch Unterschiede in der Gewinnung des Zellmaterials erklärbar.

So kamen Autoren, die die gleichen modernen immunologischen Methoden wie Feinnadelbiopsie und Zellmarkierung mit monoklonalen Antikörpern verwandten, zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen (69, 106), während andere unter Anwendung verschiedener Techniken identische Befunde erhoben (69, 249).

Vermutlich ist die Varianz der Ergebnisse dadurch bedingt, daß sich die Nieren, die untersucht wurden, in unterschiedlichen Stadien der Abstoßung befanden. Die Hinweise häufen sich, daß während früher und mittelstarker Abstoßungsreaktionen die Lymphozyten die häufigsten Effektorzellen sind, während in späten Stadien und bei schwerer Transplantatabstoßung die Makrophagen und Monozyten die dominierenden Infiltratzellen sind (102, 105, 106).

Anhand unserer Versuche können wir nicht entscheiden, wie hoch der Makrophagen-/Monozyten-Anteil in den explantierten Nieren tatsächlich war.

Zwar fanden wir vor der Passage durch die Säule nur 15 % Makrophagen, jedoch entspricht diese Zahl nicht der wirklich vorhandenen Zellzahl, da durch die Mikrofiltration zahlreiche Makrophagen ($\emptyset$ 15 μ m) im Filter (Porengröße 10 μ m) zurückgehalten werden. Die Tatsache, daß danach immerhin 15 % Makrophagen in der filtrierten Zellsuspension zu finden sind, ist darauf zurückzuführen, daß sich die Makrophagen unter dem Filtrationsdruck verformen und somit teilweise auch Filter von relativ geringer Porengröße passieren. Wie hoch aber der Anteil der Monozyten/Makrophagen vor der Mikrofiltration tatsächlich war, konnte nicht beurteilt werden, da die Suspension zu dick und stark verunreinigt war.

Da die Infiltratzellsuspension nach Mikrofiltration, die fast keinen Einfluß auf die Lymphozyten hat (58, 98), zu 67 % aus Lymphozyten bestand und die explantierten Nieren histologisch gesichert meist eine mittelschwere Transplantatreaktion aufwiesen, kann man aber davon ausgehen, daß sich im Infiltrat, entsprechend dem Stadium der Abstoßung, ursprünglich mehr als 15 % Makrophagen befanden.

An dieser Stelle sei noch einmal betont, daß es nicht Ziel dieser Arbeit war, die Zusammensetzung des gesamten Zellinfiltrates zu untersuchen, sondern möglichst reine Infiltratlymphozyten zu isolieren und diese zu charakterisieren.

Wie schon ausgeführt, gelang es uns, eine Zellsuspension zu isolieren, deren Lymphozytengehalt 92 % betrug. Diese Zellen konnten dann näher charakterisiert werden.

b) Lymphozytensubpopulationen:

Auch hinsichtlich des Anteils der Lymphozytensubpopulationen (B- und T-Lymphozyten) im Transplantat gehen die Meinungen auseinander.

Die Werte unterliegen beträchtlichen Schwankungen. Sie reichen beim Menschen von 8 - 90 % für T-Lymphozyten und 12 - 73 % für B-Zellen, bezogen auf die Gesamtlymphozytenzahl (204, 242, 249).

Bei der Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen mußten wir im Gegensatz zu anderen Untersuchern auf die Immunfluoreszenz als einzige Methode zurückgreifen, da die T-Zellmarker des Hundes nicht bekannt sind. Bei den meisten anderen Tierspezies, die bei Versuchen eingesetzt werden, sind diese Marker bekannt. Auch monoklonale Antikörper stehen bei Untersuchungen im Hunde-Modell nicht zur Verfügung.

Da durch die Immunfluoreszenz das Oberflächenimmunglobulin der B-Lymphozyten angefärbt wird, erfolgt die Bestimmung der T-Lymphozyten im Zuge eines Negativausschlusses.

Bei Untersuchung der separierten Lymphozytensuspension fanden wir 8 % B-Lymphozyten und einen Anteil von 92 % IgG-negativen Zellen, die wir als T-Lymphozyten bezeichneten. Da jedoch auch "Null-Zellen" Ig-negativ sind (32), besteht die Möglichkeit, daß ein Teil der von uns als T-Lymphozyten gewerteten Zellen in Wirklichkeit "Null-Zellen" sind. Das würde aber bedeuten, daß unser sehr hoher T-Zell-Anteil (92 %) niedriger anzusetzen wäre. Beim Menschen wurden Werte von maximal 7 - 15 % "Null-Zellen" (= Non-T, Non-B) genannt (102, 266). Bereinigt man unser Ergebnis um diesen theoretisch denkbaren, der Methode immanenten Fehler, so ergibt sich ein T-Lymphozyten-Anteil von ca. 75 %.

Bei menschlichen Nieren-Allotransplantaten wurden unter Verwendung von Feinnadelbiopsien und monoklonalen Antikörpern Werte gefunden, die damit gut übereinstimmen. Die meisten Autoren berichten über einen T-Lymphozyten-Anteil (= OKT 3-positive Zellen) von 65 - 70 % (42, 69, 87). Allerdings werden auch Zahlen von bis zu 90 % T-Zellen genannt (204), was mit unseren Beobachtungen übereinstimmen würde. Da in den späteren Stadien der Transplantatreaktion B-Zellen vermutlich eine wichtige Rolle spielen (102), sind Zahlen von bis zu 73 % B-Lymphozyten (242) evtl. dadurch bedingt, daß das Transplantat zu einem sehr späten Zeitpunkt der Abstoßungsreaktion entnommen wurde.

Eine andere Möglichkeit der Erklärung dieser Ergebnisse wäre ein selektiver T-Zellenverlust während der Zellseparation aus diesen Nieren. Da wir vor und nach Säulenseparation fast den gleichen B-Lymphozyten-Gehalt (9- bzw. 8 %) feststellten, scheidet eine Subklassenselektion durch die Sephadex-Säule aus.

II. Funktion der separierten Lymphozyten:

Wie schon mehrfach erwähnt, ist der T-Lymphozyt zumindest während der mittelstarken akuten Abstoßungskrise die ausschlaggebende Zelle (5, 42, 197).

Dabei ist sie als zytotoxische Effektorzelle wirksam (160) und steht unter dem regulativen Einfluß von T-Helfer- und Suppressorzellen (206).

Unser Interesse galt vor allem der Frage, ob die peripher gemessene Reaktion von Lymphozyten mit dem Verhalten der Zellen innerhalb der in Abstoßung befindlichen Nieren übereinstimmt. Wie wir durch die Immunfluoreszenz nachweisen konnten, besteht das lymphozytäre Infiltrat der abgestoßenen Nieren zu 92 % aus IgG-negativen Lymphozyten, was als Hinweis auf die überwiegende

Beteiligung zellulärer Mechanismen in diesem frühen Stadium der akuten Abstoßungsreaktion zu werten ist. Aufgrund von Untersuchungen anderer Autoren (68, 102, 160, 197, 249) ist bekannt, daß die Zerstörung des Transplantates hauptsächlich durch die Aktion spezifischer zytotoxischer Lymphozyten, die für ihre Aktivierung T-Helfer-Zellen brauchen, bewirkt wird. Die Stimulierbarkeit der separierten Nierenlymphozyten durch die Mitogene PHA, PWM und ConA lag bei unseren Untersuchungen zwischen 75 und 86 % unter der der gleichzeitig stimulierten peripheren Lymphozyten. Für diese Beobachtung gibt es verschiedene Erklärungen:

- a) Könnte es daran liegen, daß es sich bei den Nierenlymphozyten um eine hochgereinigte Präparation handelt, die nur noch 0,75 % Makrophagen/Monozyten enthält. Diese Zellen sind für eine maximale Stimulierbarkeit durch Mitogene nötig (59, 62, 136, 139). Allerdings dürfte auch noch die geringe Makrophagendichte von nur 0,75 % in der Zellsuspension genügen, da beschrieben wurde, daß weniger als 1 % Makrophagen zur Stimulation genügen (3). Dabei ist es die Aufgabe des Makrophagen, dem T-Lymphozyten das lösliche Antigen oder das Mitogen zu präsentieren (19).
- b) Wurde beschrieben, daß weniger als 2 % Nierenzellen in einer Lymphozytensuspension genügen, um eine Reduzierung der lymphoproliferativen Antwort auf PHA zu bewirken. Hierfür wurde ein löslicher Nierenzellefaktor verantwortlich gemacht (170). Unsere Zellsuspension enthielt nach Separation zwar noch 2,8 % Nierenzellen, jedoch dürfte diese geringfügige Kontamination nicht für die erhebliche Verminderung (75 %) der Stimulation verantwortlich sein.

Eine Kontamination der Lymphozytensuspension mit zu vielen Erythrozyten soll eine Hemmung der Proliferation nach PHA-Stimulation bewirken (57). Bei uns war eine derartige Verunreinigung aber nicht feststellbar.

- c) Wie bei der Besprechung der Methodik bereits ausgeführt wurde, sind für die Proliferation der Lymphozyten Helferzellen nötig. Somit wäre unsere geringe Infiltratzell-Stimulierbarkeit gut mit einer geringen T-Helferzellaktivität bzw. -Anwesenheit innerhalb der abgestoßenen Niere in Einklang zu bringen. In der Peripherie findet sich ein normaler Helferzelltonus (gute Mitogenstimulierbarkeit). Über ähnliche Ergebnisse berichteten Ascher (5) und Wembacher (261) bei der Untersuchung des Zellinfiltrates in transplantierten Polyurethan-Schwämmen.

Van Es (69) fand, daß bei nicht beherrschbarer Abstoßungsreaktion im Transplantat eine Anreicherung von OKT 8-reaktiven Zellen (= zytotoxische -/Suppressor-Zellen) und eine relative Abnahme der OKT 4-Zellen (= Helfer-Lymphozyten) stattfindet. Er konnte damit die Ergebnisse anderer bestätigen, die ein erniedrigtes oder umgekehrtes Verhältnis von OKT 4-/OKT 8-Zellen im Lymphozyteninfiltrat als prognostisch ungünstiges Zeichen erkannten (44,105). Hammer (105) fand mittels monoklonaler Antikörper, daß die Zahl der zytotoxischen Zellen im Transplantat verglichen mit der peripheren Population signifikant erhöht ist. Dies wird durch Beobachtungen von Cosimi (47) bestätigt, der fand, daß ein erhöhtes Verhältnis von zirkulierenden Helfer- zu zytotoxischen-/Suppressor-Zellen immer mit Transplantatabstoßung endete. Das wiederum bedeutet, daß die Bildung der zytotoxischen T-Lymphozyten nicht im abgestoßenen Organ stattfindet, sondern daß Lymphozyten, die in der Niere spezifisch sensibilisiert wurden, in der Peripherie entsprechende zytotoxische

Lymphozyten rekrutieren und diese auch peripher unter Mitwirkung von T-Helfer-Zellen proliferieren und erst dann durch Lymphokine in das Transplantat gelockt werden (122).

- d) Die T-Lymphozyten sind zu einem großen Teil ausgereifte Endzellen, die sich auch durch Mitogene nicht mehr zur Teilung anregen lassen.
- e) Vorstellbar ist auch der Einfluß unspezifischer Suppressorzellen auf die Proliferation nach Mitogengabe (78, 196). Ob diese allerdings inhibierend auf die Zellteilung von T-Helfer- oder zytotoxischen Zellen einwirken, ist schwer zu entscheiden.

Betrachtet man die Ergebnisse der MLC, so ist auch hier ein gravierender Unterschied zwischen Peripherie und Transplantat auffällig.

Die peripheren Spender- und Empfängerlymphozyten stimulieren sich gegenseitig gut. Diese Werte stimmen mit den präoperativ gemessenen überein.

Stimuliert man periphere Spenderzellen mit Nierenlymphozyten, so stimulieren diese deutlich schlechter (26 %) als die peripheren Zellen, was auf das Vorhandensein von Passenger-Leukozyten oder Suppressorzellen innerhalb der stimulierenden Population hinweisen könnte.

Stimulation der peripheren Empfängerzellen durch Nierenlymphozyten resultiert erwartungsgemäß in einer Proliferation, die um 94 % niedriger liegt, als wenn man mit Spenderlymphozyten stimuliert. Daß die Stimulation hier höher als der Kontrollwert (EL + ELx) ist, kann auch in diesem Falle mit dem Vorhandensein von Passenger-Leukozyten, die ja autolog mit dem Spender und nicht mit dem Empfänger sind, erklärt werden.

Interessant ist die Beobachtung, daß Nierenlymphozyten um über 50 % schlechter stimuliert werden als die peripheren Empfängerlymphozyten, setzt man beide dem gleichen allogenen Antigenstimulus in Form der Spenderlymphozyten aus. Dies ist ein bekanntes Phänomen und wurde schon von anderen Autoren beschrieben (84, 119). Auch in diesem Fall dürfte die geringe Stimulierbarkeit der Nierenlymphozyten weder auf den geringen Makrophagengehalt, noch auf die Nierenzellkontamination zurückzuführen sein.

Vielmehr handelt es sich bei den isolierten Lymphozyten zu einem großen Teil um Endzellen. Die Zellen, die noch zur Proliferation fähig sind, werden nicht nur durch den Mangel an Helferzellen eingeschränkt, sondern sie werden sehr wahrscheinlich durch Suppressorzellen aktiv an der Proliferation gehindert (50, 250).

Man kann also sagen, daß die Nierenlymphozyten zwar gute Stimulatorzellen, aber schlechte Responderzellen sind.

Die Ergebnisse im Suppressor-Helferzell-Assay zeigen deutlich, daß in der Niere tatsächlich Suppressorzellen kumulieren. Dabei ist die spezifische suppressive Potenz mit 60 % um 20 % höher als die unspezifische.

Dieses Ergebnis korreliert gut mit den Ergebnissen anderer, die fanden, daß für eine maximale Suppression der MLC eine MHC (Major-histocompatibility-complex)-Homologie mit dem MLC-Responder - aber nicht mit dem Stimulator nötig ist (262). Während Crosier (49) der Meinung ist, daß es nur einen Suppressor-Faktor gibt, der sowohl auf die Responder als auch auf die Stimulator-Population wirkt, glaubt Bensussan (20), daß es 2 verschiedene Suppressorfaktoren gibt, wobei einer spezifisch für die autologen Responderzellen sein soll, während der andere unspezifisch auf die Stimulatorzellen einwirkt und so indirekt alle Responderzellen supprimiert.

Auch Kapp berichtet über die Existenz von 2 verschiedenen Suppressorzellen (130). Eine dieser Zellen soll spezifisch und strahlensensibel, die andere unspezifisch und nicht strahlensensibel sein. Darüber, daß die unspezifische Suppressorzelle strahlenresistent ist, besteht Einigkeit (202).

Unterschiedliche Angaben gibt es allerdings über die spezifischen Suppressorzellen: So halten sie Whisler (262) und Kapp (130) für strahlensensibel, während die Ergebnisse von Bensussan (20) und auch unsere eher dafür sprechen, daß auch sie - wie die unspezifischen - strahlenresistent sind. Wären die spezifischen Suppressorzellen strahlensensibel, d. h. wären sie auf Zellteilung angewiesen, so dürften sie nach Bestrahlung mit 2000 rad nicht eine Suppression von 60 % und damit noch 20 % mehr als die unspezifischen Suppressorzellen bewirken.

Bei der Suppressorzelle, die in erster Linie für die hier beschriebenen Phänomene verantwortlich ist, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen OKT 8-positiven Lymphozyt (42).

Zwar wurden auch schon Makrophagen als Suppressorzellen beschrieben (147, 269), jedoch scheidet deren Einfluß hier aus, da unsere Zellsuspension praktisch frei von Makrophagen war. Mit unseren Ergebnissen können wir Berichte anderer nicht bestätigen, die fanden, daß bei 90 % der Nierentransplantat-Empfänger im peripheren Blut Suppressorzellen feststellbar seien, die in der Lage sind, setzt man sie in eine MLC als "third-party"-Zelle ein, diese Reaktion um bis zu 50 % zu unterdrücken (2).

Unsere Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß Suppressorzellen zwar in geringer Konzentration im peripheren Blut zirkulieren, sie jedoch innerhalb des Transplantates angereichert werden und hier lokal, mehr spezifisch als unspezifisch, immunologische Reaktionen inhibieren.

Jedoch sind sie nicht in der Lage, die Bildung zytotoxischer Lymphozyten außerhalb des Transplantates in der Peripherie zu unterdrücken. So kommt es ständig zum Influx neuer zytotoxischer Lymphozyten in die Niere und die Zerstörung des Organes schreitet fort, obwohl lokal ein hoher Suppressorzell-Tonus herrscht. Daß die beim Hund gefundenen Ergebnisse in der Tendenz auch auf den Menschen übertragbar sind, konnten wir am Beispiel einer menschlichen Niere demonstrieren.

Aufgrund der hier erhobenen Befunde, die eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem immunologischen Geschehen in der Peripherie und in situ im Transplantat aufzeigen, erscheint es sinnvoll, nierentransplantierte Patienten einem immunologischen Monitoring zu unterwerfen, das nicht nur periphere, sondern auch zentrale im transplantierten Organ vor sich gehende Veränderungen erfaßt.

Als Mittel der Wahl bietet sich hier nach heutigem Wissensstand die Kombination von Feinnadelbiopsie des Transplantates mit Untersuchung des peripheren Blutes an.

Damit sollte es möglich sein, Abstoßungsreaktionen rechtzeitig zu erkennen und eine auf den Einzelfall optimal abgestimmte Therapie einzuleiten.

E ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte eine Methode zur Lymphozytenseparation aus abgestoßenen allogenen Nierentransplantaten entwickelt werden, die es ermöglicht, die Lymphozyten, die das Organ während der Abstoßungsreaktion infiltrieren, nach Art und Funktion zu charakterisieren.

Die hier vorgestellte Methode der Lymphozytenisolation mittels Sephadex-G 10-Glasperlen-Säulen ermöglicht eine durchschnittliche Lymphozytenausbeute von 370 000 pro Gramm Nierengewebe.

Dabei sind die Zellen zu 91 % vital.

Da wir keine selektiven Lymphozytenverluste während der einzelnen Separationsstufen feststellen konnten, entspricht die Subpopulationenverteilung den realen Verhältnissen in situ.

Die die Niere infiltrierenden Lymphozyten bestanden zu 8 % aus B-Zellen und zu 92 % aus IgG-negativen Zellen, die hauptsächlich aus T-Lymphozyten bestehen.

Da die Infiltratlymphozyten durch Mitogene um 75 - 86 % schlechter stimulierbar sind als die peripheren Lymphozyten, handelt es sich wahrscheinlich um zytotoxische Endzellen.

Im Transplantat befinden sich im Gegensatz zur Peripherie nur wenige Helferzellen, was sowohl durch die schlechte Mitogenstimulierbarkeit der Infiltratzellen, als auch durch ihre schlechten "Responder-Eigenschaften" in der MLC belegt wird. Im Suppressor-Helferzell-Assay zeigte es sich, daß in der Niere potente strahlenresistente Suppressorzellen kumulieren, die in der Lage sind, spezifische und unspezifische Lymphozytenproliferation zu hemmen.

F LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abel H.H., B.Schneider:
Einige "Normwerte" des Blutes für den Hundeauszuchtstamm Brack:Beagle (Beagle/Brackwede).
Z.Versuchstierk. 15, 160-166 (1973)
- 2 Agostino G.J., B.D.Kahan, R.H.Kerman:
Suppression of mixed leucocyte culture using leucocytes from normal individuals, uremic patients and allograft recipients.
Transplantation 34, 267-371 (1982)
- 3 Alter B.J., F.H.Bach:
Lymphocyte reactivity in vitro.
I.Cellular reconstruction of purified lymphocyte response.
Cell.Immunology 1, 207-218 (1970)
- 4 Anderson N.G.:
An introduction to particle separations in zonal centrifuges.
Natl.Cancer Inst., Monogr. 21, 9-39 (1966)
- 5 Ascher N.L., R.M.Ferguson, R.Hoffmann, R.L.Simmons:
Partial characterization of cytotoxic cells infiltrating sponge matrix allografts.
Transplantation 27, No 4, 254-259 (1979)
- 6 Ascher N.L., S.Chen, R.Hoffmann, R.L.Simmons:
Maturation of cytotoxic effector cells at the site of allograft rejection.
Transplant.Proc. 13, 1105-1107 (1981)
- 7 Ascher N.L., R.Hoffmann, D.W.Hanto, R.L.Simmons:
Cellular events within the rejecting allograft.
Transplantation 35, 193-197 (1983)

- 8 Ascher N.L., S.Chen, R.Hoffmann, R.L.Simmons:
Requirements for the maturation of cytotoxic effector
cells at the allograft site.
Transplant.Proc. 15, 390-392 (1983)
- 9 Bach B.A.; L.Sherman, B.Benacerraf, M.I.Greene:
Mechanisms of regulating cell-mediated immunity.
II.Induction and suppression of delayed-type hyper-
sensitivity to azobenzenear-sonate-coupled-syngeneic
cells.
J.Immunol. 121, 1460-1468 (1978)
- 10 Bach F.H., M.L.Bach, P.M.Sondel:
Differential function of major histocompatibility
complex antigens in T-lymphocyte activation.
Nature 259, 273-281 (1976)
- 11 Bach M.K., J.R.Brashler:
Isolation of subpopulation of lymphocytic cells by the
use of isotonically balanced solutions of ficoll.
I.Development of methods and demonstration of the
existence of a large but finite number of subpopulations.
Exp.Cell.Res. 61, 387-396 (1970)
- 12 Bain B., M.R.Vas, L.Lowenstein:
The development of large immature mononuclear cells
in mixed leukocyte cultures.
Blood 23, 108-116 (1964)
- 13 Balch M., A.G.Diethelm:
Current Research Review.
The Pathophysiology of renal allograft rejection:
a collective review.
J.Surg.Res. 12, 350-377 (1972)

- 14 Baroni C.D., M.Valtieri, A.Stoppacciaro, L.P.Ruco, S.Uccini, C.Ricci:
The human thymus in ageing: histologic paralleled by increased mitogen response and by enrichment of OKT 3⁺ lymphocytes.
Immunology 50, 519-528 (1983)
- 15 Batchelor J.R., K.I.Welsh:
Mechanisms of enhancement of kidney allograft survival.
Brit.Med.Bull. 32, 113-117 (1976)
- 16 Batchelor J.R.:
Immune mechanisms responsible for the prolonged kidney allograft survival in immunologic enhancement.
Transplant.Proc. 13, 562-565 (1981)
- 17 Batchelor J.R., R.I.Lechler:
Why MHC incompatible grafts induce strong primary alloimmunity .
Transplant.Proc. 14, 535-537 (1982)
- 18 Batchelor J.R., B.E.Phillips, D.Grennan:
Suppressor cells and their role in the survival of immunologically enhanced rat kidney allografts.
Transplantation 37, 43-46 (1984)
- 19 Ben-Sasson S.Z., J.Kagan:
Antigen induced proliferation of murine T-lymphocytes in vitro.
II.The effect of different macrophage populations on the antigen-induced proliferative response.
J.Immunol.Meth. 41, 321-331 (1981)
- 20 Bensussan A., D.Klatzmann, J.C.Gluckman, J.Kalil, J.Dausset, M.Sasportes:
Probable role of suppressor cells and factors in kidney graft survival.
Transplant.Proc. 14, 584-587 (1982)

- 21 Berlinger N.T., C.Lopez, R.A.Good:
Facilitation of attenuation of mixed leucocyte culture
responsiveness by adherent cells.
Nature 260, 145-146 (1976)
- 22 Bird A.G., L.Hammarström, C.I.E.Smith, S.Britton:
Polyclonal human T-lymphocyte activation results in
the secondary functional activation of the human
B-lymphocyte.
Clin.exp.Immunol. 43, 165-173 (1981)
- 23 Böyum A.:
Isolation of leucocytes from human blood.
A two-phase system for removal of red cells with
methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl.97, 9-29 (1968)
- 24 Böyum A.:
A one-stage procedure for isolation of granulocytes
and lymphocytes from human blood. (General sedimentation
properties of white blood cells in a 1 g gravity field).
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl.97, 51-76 (1968)
- 25 Böyum A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from
human blood. (Isolation of mononuclear cells by one
centrifugation and of granulocytes by combining centri-
fugation and sedimentation at 1 g).
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21, Suppl.97, 77-89 (1968)
- 26 Borel J.F., C.Feurer, H.U.Gubler, H.Stähelin:
Biological effects of Cyclosporin A:
A new antilymphocytic agent.
Agents and Actions 6/4, 468-475 (1976)

- 27 Brand L., J.Börjeson, A.Nordén, I.Olsson:
Separation of lymphocytes from peripheral blood by
means of a glass wool column.
A method for in vitro culture of lymphocytes.
Acta med.Scand. 172, 459-462 (1962)

- 28 Brendel W., W.Land:
Überraschende Ergebnisse durch intravenöse Therapie
mit Antilymphozytenserum bei Organtransplantationen.
Dtsch.Med.Wschr. 93, 2309-2313 (1968)

- 29 Brendel W.:
Clinical experiences with antilymphocyte globulin.
Proc.4th Congr.Nephrol. Stockholm 1969, 3, 245-255,
Karger: Basel-München-New York (1970)

- 30 Brendel W.:
The clinical use of ALG.
Transplant.Proc. 3, 280-286 (1971)

- 31 Brochier J.:
MLR-R and MLR-S gene products are expressed on dif-
ferent lymphoid cells.
Transplantation 24, 63-69 (1977)

- 32 Brown B., M.F.Greaves:
Cell surface markers for human T- and B-lymphocytes.
Europ.J.Immunol. 4, 302-310 (1974)

- 33 Brunner K.T., J.Mauel, H.Rudolf, B.Chapuis:
Studies of allograft immunity in mice.
I.Induction, development and in vitro assay of
cellular immunity.
Immunology 18, 501-515 (1970)

- 34 Calne R.Y., D.J.G.White, D.B.Evans, S.Thiru, B.Hen-
derson, D.V.Hamilton, K.Rolles, P.Mc Master, T.J.Duffy,
B.R.D.Mac Dougall, R.Williams:
Cyclosporin A in cadaveric organ transplantation.
Brit.med.J. 282, 934-936 (1981)

- 35 Calne R.Y., R.Williams, M.Lindop, J.V.Farman, M.E.Tolley,
K.Rolles, B.R.D.Mac Dougall, J.Neuberger, R.J.Wyke, A.T.
Raftery, T.J.Duffy, D.G.D.Wight, D.J.G.White:
Improved survival after orthotopic liver grafting.
Brit.med.J. 283, 115-118 (1981)

- 36 Cantor H., E.A.Boyse:
Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different
Ly-antigens.
J.exp.Med. 141, 1376-1389 (1975)

- 37 Cantor H., R.K.Gershon:
Immunological circuits: cellular composition.
Fed.Proc. 38, 2058-2064 (1979)

- 38 Carrel A.:
La technique opérative des anastomoses vasculaires
et la transplantation des viscères.
Lyon.med. 98, 859-864 (1902)

- 39 Castro J.E.:
Tumor and transplantation immunology.
Brit.J.Anaesth. 51, 29-36 (1979)

- 40 Cerottini J.C., T.K.Bunner:
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and
tumor immunity.
Adv.Immunol. 18, 67-132 (1974)

- 41 Charpentier B.M., P.Lang, B.Martin, D.Fries:
Specific recipient-donor unresponsiveness mediated
by a suppressor cell system in human kidney allograft
tolerance.
Transplantation 33, 470-477 (1982)
- 42 Charpentier B.M., M.A.Bach, P.Lang, D.Fries:
Expression of OKT 8 antigen and Fc-receptors by sup-
pressor cells mediating specific unresponsiveness between
recipient and donor in renal-allograft-tolerant patients.
Transplantation 36, 495-501 (1983)
- 43 Chess L., R.P.Mac Dermott, S.F.Schlossman:
Immunologic functions of isolated human lymphocyte
subpopulations.
I.Quantitative isolation of human T- and B-cells and
response to mitogens.
J.Immunol. 113, 1113-1121 (1974)
- 44 Colvin R.B., A.B.Cosimi, R.C.Burton:
Circulating T-cell subsets in human renal allograft
recipients: the OKT 4/OKT 8 cell ration correlates
with reversibility of graft injury.
IXth Int.Congr.Transpl.Soc, Brighton, 23-27 September 1982
- 45 Corrigan A., R.O'Kennedy, H.Smith:
Lymphocyte membrane alterations caused by nylon wool
column separation.
J.Immunol.Meth. 31, 177-182 (1979)
- 46 Corson J.M.;
The pathologist and the kidney transplantation.
Pathol.Ann. 7, 251-292 (1972)
- 47 Cosimi A.B., R.B.Colvin, R.C.Burton:
Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immuno-
logic monitoring and treatment in recipients of renal
allografts.
N.Engl.J.Med. 305, 308-314 (1981)

- 48 Coulson A.S., D.G.Chalmers:
Effects of phytohemagglutinin on leucocytes.
Lancet 2, 819-820 (1964)
- 49 Crosier P.S.:
Regulation of human cytotoxic lymphocyte responses.
II. Suppression by a soluble factor produced by primed
lymphocytes.
Immunology 43, 19-24 (1981)
- 50 Crosier P.S., B.C.Broom:
Regulation of human cytotoxic lymphocyte responses.
I. Non-cytolytic suppression mediated by alloantigen-
activated cells.
Immunology 43, 11-18 (1981)
- 51 Curling J.M.:
The use of Sephadex^R in the separation, purification
and characterization of biological materials.
In: Exp.in Physiol.and Biochem. 4, 417-485, ed.: Kerkut,
G.A., Acad.Press, London-New York (1970)
- 52 Curtis J.J., B.A.Lucas, T.A.Kotchen, R.G.Luke:
Surgical therapy for persistent hypertension after
renal transplantation.
Transplantation 31, 125-128 (1981)
- 53 Darfler F.J., P.A.Insel:
Serum-free culture of resting, PHA - stimulated and
transformed lymphoid cells, including hybridomas.
Exp.Cell Res. 138, 287-295 (1982)
- 54 Dean, J.H., J.S.Silva, J.L.McCoy, C.M.Leonard, G.B.
Cannon, R.B.Herberman:
Functional activities of rosette separated human
peripheral blood leucocytes.
J.Immunol. 115, 1449-1454 (1975)

- 55 Debray-Sachs M., M.Dy, J.Hamburger:
Role of macrophage activation in allograft immunity:
In vitro studies.
Ann.Immunol. (Inst.Pasteur) Vol 130 C, 721-733 (1979)
- 56 Decastello von A.:
Über experimentelle Nierentransplantation.
Wien.klin.Wschr. 15, 317-318 (1902)
- 57 De Jong B., G.J.P.A. Anders, V.J.S.Idenburg,
J.Zijlstra:
Influence of erythrocyte contamination on the optimal
phytohaemagglutinin concentration in chinese hamster
lymphocyte cultures.
J.Immunol.Meth. 61, 43-48 (1983)
- 58 Denk S., W.Heinkelmann, B.Landauer, O.Petrowicz,
St.v.Sommoggy, G.Blümel:
Untersuchungen verschiedenartiger Bluttransfusions-
filter unter druckdynamischen Bedingungen.
In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin und
Immunhaematologie Bd. 3, 605-608, Medicus-Verlag Berlin
(1977)
- 59 De Vries E., G.J.M.Lafeber, J.P.van der Weij, A.C.van
Buisen, P.C.J.Leijh, A.Cats:
Pokeweed-mitogen induced lymphocyte proliferation:
The effect of stimulation on mononuclear phagocytic
cells.
Immunology 40,177-182 (1980)
- 60 Dewolf W.C.:
Transplantation immunology.
Investigative Urology 18, 317-319 (1981)

- 61 Dieffenbach J.:
Chirurgische Erfahrungen, besonders über die Wiederherstellung zerstörter Theile des menschlichen Körpers nach neuen Methoden.
Hrsg.: Th.Enslin, 1-40 Berlin (1829)
- 62 Dillner - Centerlind M.L., B.Axelsson, S.Hammarström, U.Hellström, P.Perlmann:
Interaction of lectins with human T-lymphocytes. Mitogenic properties, inhibitory effects, binding to the cell membrane and to isolated surface glycopeptides. Eur.J.Immunol. 10, 434-442 (1980)
- 63 Dutton R.W.:
Suppressor-T-cells.
Transplant.Rev. 25, 39-63 (1975)
- 64 Dutton R.W., P.R.Danfili, S.L.Swain:
Alloreactivity, the development of the T-cell repertoire and the understanding of T-cell function. Immunol.Rev. 42, 20-59 (1978)
- 65 Dwyer J.M., F.O.Finkelstein, R.J.Mangi, K.Fisher, E.Hendler:
Assessment of the adequacy of immunosuppressive therapy using microassay techniques to study immunological competence.
Transplant.Proc.7 Suppl. 1, 785-791 (1975)
- 66 Eigler J.:
Die akute Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation. Med.Klin. 73, 1682-1689 (1978)
- 67 Epstein L.B., H.W.Kreth, L.A.Herzenberg:
Fluorescence-activated cell sorting of human T- and B-lymphocytes. II. Identification of the cell type responsible for interferon production and cell proli-

feration in response to mitogens.

Cell.Immunol. 12, 407-421 (1974)

- 68 Es van A., W.M.Baldwin, P.J.Oljans, H.J.Tanke, J.Ploem,
L.A. van Es:

Expression of HLA-DR on T-lymphocytes following renal
transplantation and association with graft-rejection
episodes and cytomegalovirus infection.

Transplantation 37, 65-69 (1984)

- 69 Es van A., C.J.L.M.Meyer, P.J.Oljans, H.J.Tanke,
L.A. van Es:

Mononuclear cells in renal allografts. Correlation
with peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and
graft prognosis.

Transplantation 37, 134-139 (1984)

- 70 Ettenger R.B., P.I.Terasaki, A.Ting, M.H.Malekzadeh,
A.J.Pennisi, C.Uittenbogaart, R.Garrison, R.N.Fine:
Anti-B-lymphocytotoxins in renal-allograft rejection.
N.Engl.J.Med. 295, 305-309 (1976)

- 71 European Multicenter Trial, preliminary results of a-:
Cyclosporin A as sole immunosuppressive reagent
in recipients of kidney allografts from cadaver
donors.

Lancet 11, 57-60 (1982)

- 72 Evans R., C.K.Grant, H.Cox, K.Steele, P.Alexander:
Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically
specific macrophage arming factor.
J.Exp.Med. 136, 1318-1322 (1972)

- 73 Farnes P., B.E.Barker, L.E.Brownhill, H.Fanger:
Mitogenic activity in *phytolacca americana* (Pokeweed).
Lancet 2, 1100-1101 (1964)

- 74 Fauci A.S., K.R.Pratt, G.Whalen:
Activation of human B-lymphocytes.
VIII. Differential radiosensitivity of subpopulations
of lymphoid cells involved in the polyclonally induced
PFC responses of peripheral blood B-lymphocytes.
Immunology 35, 715-720 (1978)
- 75 Ferguson R.M., J.J.Rynasiewicz, D.E.R.Sutherland,
R.L.Simmons:
Cyclosporin A in renal transplantation: a prospective
randomized trial.
Surgery 92, 175-182 (1982)
- 76 Fineman S.M., F.B.Mudawar , R.S.Geha:
Characteristics and mechanisms of action of the
ConA-activated suppressor cells in man.
Cell.Immunol. 45, 120-132 (1979)
- 77 Finkelstein F.O., N.J.Siegel, C.Bastl, J.N.Forrest,
M.Kashgarian:
Kidney transplant biopsies in the diagnosis and management
of acute rejection reactions.
Kidney International 10, 171-178 (1976)
- 78 Folch H., B.H.Waksman:
The splenic suppressor cell.
II.Suppression of the mixed lymphocyte reaction by
thymus dependent adherent cells.
J.Immunol.113, 127-139 (1974)
- 79 Fournier C., J.Charrière:
Activation of human T-cell subpopulations bearing
receptors for autologous erythrocytes by Concanavalin A.
J.Immunol. 121, 771-776 (1978)

- 80 Fox R.A., K.Rajaraman:
Macrophage migration stimulation factor, migration inhibition factor and the role of suppressor cells in their production.
Cell. Immunology 47, 69-78 (1979)
- 81 Garvin J.E.:
Factors affecting the adhesiveness of human leucocytes and platelets in vitro.
J.Exp.Med. 114, 51-72 (1961)
- 82 Geha R.S.:
Regulation of human B-cell activation.
Immunol.Rev. 45, 275-305 (1979)
- 83 Gershon R.K., K.Kondo:
Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes.
Immunology 18, 723-737 (1970)
- 84 Goeken N.E., J.S.Thompson:
Kinetic characteristics of human suppressor cells.
Transplant.Proc. 11, 1823-1826 (1979)
- 85 Goldman R., W.E.Goodwin, J.J.Kaufman, D.C.Martin, R.J.Glasscock, D.C.Nourok:
Sixteen cases of renal homotransplantation.
Arch.Intern.Med. 114, 601-609 (1964)
- 86 Golstein P., H.Wigzell, H.Blomgren, E.A.J.Svedmyr:
Cells mediating specific in vitro cytotoxicity.
II.Probable autonomy of thymus-processed lymphocytes (T-cells) for the killing of allogeneic target cells.
J.Exp.Med. 135, 890-906 (1972)

- 87 Gorovoy M.R., M.A.Reddish, G.J.Busch, N.L.Tilney:
Immunoglobulin-secreting cells recovered from rejected
human renal allografts.
Transplantation 33, 109-111 (1982)
- 88 Goulmy E., G.Persijn, E.Blokland, J.D'Amaro, J.J.van Rood:
Cell-mediated lympholysis studies in renal allograft re-
cipients.
Transplantation 31, 210-217 (1981)
- 89 Gowans J.L.:
Cellular mediators of allograft immunity.
Transplant. Proc. 9, 685-690 (1977)
- 90 Granger G.A., R.S.Weiser:
Homograft target cells: Contact destruction in vitro
by immune macrophages.
Science 151, 97-99 (1966)
- 91 Greaves M.F., G.Brown:
Purification of human T- and B-lymphocytes.
J.Immunol. 112 No 1, 420-423 (1974)
- 92 Greenwalt T.J., M.S.Gajewski, J.L. McKenna:
A new method for preparing buffy coat-poor blood.
Transfusion 2, 221-229 (1962)
- 93 Griffith B.P., R.L.Hardesty, G.M.Deeb, T.E.Starzl,
H.T.Bahnsen:
Cardiac transplantation with Cyclosporin A and
Prednisone.
Ann.Surg. 196, 324-329 (1982)
- 94 Groenewegen G., W.A.Buurman, G.M.A.A.Jeunhomme, C.J.van
der Linden, P.A.Vegt, G.Kootstra:
In vitro stimulation of lymphocytes by vascular endo-
thelial cells.

A study with canine arterial and venous endothelial cells.

Transplantation 37, 206-210 (1984)

- 95 Grosse-Wilde H., H.M.Vriesendorp, R.Wank, W.Mempel, B.Dechamps, U.Honauer, P.Baumann, B.Netzel, H.J.Kolb, E.D.Albert:
Identification of four MLC-specificities in the dog.
Tissue Antigens 4, 229-237 (1974)
- 96 Guttman R.D., R.R.Lindquist, S.A.Ockner:
Renal transplantation in the inbred rat.
Transplantation 8, 472-484 (1969)
- 97 Guttman R.D., R.D.C.Forbes:
Passenger leucocytes revisited.
Transplant.Proc. 16, 37-39 (1984)
- 98 Haas S., G.Blümel:
Nutzen und Gefahren von Blutfiltern.
In: Erlanger Anästhesie-Seminare (Hrsg.: E.Reigheimer)
2, 121-127 (1977)
- 99 Häyry P.:
The role of factors in fresh serum in the attachment and growth of HeLa-cells on glass.
Ann.Med.exp.Fenn. 44, Suppl. 8, 9-47 (1966)
- 100 Häyry P., V.Defendi:
Mixed lymphocyte cultures produce effector cells: Model in vitro for allograft rejection.
Science 168, 133-135 (1970)
- 101 Häyry P., E.v.Willebrand, A.Soots:
In situ effector mechanisms in rat kidney allograft rejection. III.Kinetics of the inflammatory response and generation of donor-directed killer-cells.
Scand.J.Immunol. 10, 95-108 (1979)

- 102 Häyry P.:
Immunobiology of transplant rejection.
Ann.Clin.Res. 13, 172-198 (1981)
- 103 Hamburger J., A.Dimitriu, L.Bankir, M.Debray-Sachs,
J.Auvert:
Collection of lymph from kidneys homotransplanted in
man: Cell transformation in vivo.
Nature 232, 633-634 (1971)
- 104 Hammarström L., A.G.Bird, S.Britton, C.I.E.Smith:
Pokeweed mitogen induced differentiation of human
B-cells. Evaluation by a protein A haemolytic plaque
assay.
Immunology 38, 181-189 (1979)
- 105 Hammer C., W.Land, J.Stadler, C.Koller, W.Brendel:
Lymphocyte subclasses in rejecting kidney grafts
detected by monoclonal antibodies.
Transplant. Proc. 15, 356-360, 1983
- 106 Hancock W.W., N.M.Thomson, R.C.Atkins:
Monoclonal antibody analysis of interstitial cell
infiltrate during human renal allograft rejection.
Transplant. Proc. 15, 352-355 (1983)
- 107 Hansen C.B., G.Y.Gillespie, S.W.Russel:
Isolation of T-lymphocytes from disaggregated tumors
with high purity and good percentage recovery.
J.Natl.Cancer Inst. 59 No 1, 273-275 (1977)
- 108 Hanto D.W., U.T.Hopt, R.Hoffman, R.L.Simmons:
Lymphocyte recruitment, regional blood flow and vascular
permeability at sites of allogeneic cellular interactions.
J.Immunol. 129, 2437-2443 (1982)

- 109 Hanto D.W., U.T.Hopt, R.Hoffman, R.L.Simmons:
Recruitment of unsensitized circulating lymphocytes
to sites of allogeneic cellular interactions.
Transplantation 33, 541-546 (1982)
- 110 Harada H., T.Kasahara, K.Ogata, K.Shioiri-Nakano,
T.Kawai:
Effect of Staphylococcus aureus Cowan I bacteria on
the mitogenic response of human B-cell subsets.
Immunology 47, 557-567 (1982)
- 111 Hardin J.A., T.M.Chused, A.D.Steinberg:
Suppressor cells in the graft versus host reaction.
J.Immunol. 111, 650-651 (1973)
- 112 Hartzmann R.J., M.Segall, M.L.Bach, F.H.Bach:
Histocompatibility matching.
VI.Miniaurization of the mixed leucocyte culture
test: A preliminary report.
Transplantation 11, 268-273 (1971)
- 113 Hastings J., S.Freedman, O.Rendon, H.L. Cooper,
K.Hirschhorn:
Culture of human white cells using differential
leucocyte separation.
Nature 192, 1214-1215 (1961)
- 114 Hathcock K.S., R.J.Hopt:
Regulatory mechanisms in cell-mediated immuno response.
V.Distinct Lyt subsets mediate antigen-specific and
antigen-nonspecific suppression.
Transplantation 36, 298-303 (1983)
- 115 Haynes B.F., A.S.Fauci:
Activation of human B-lymphocytes.
V.Kinetics and mechanisms of suppression of plaque

forming cell responses by Con A generated suppressor cells.

J.Immunol. 120, 700-708 (1978)

- 116 Haynes B.F., G.S.Eisenbarth, A.S.Fauci:
Human lymphocyte antigens: production of a monoclonal antibody that defines thymus-derived lymphocyte subsets.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 5829-5833 (1979)
- 117 Health care financing administration.
End stage renal disease: second annual report to Congress.
Washington, D.C. : Department of Health and Human Services (1980)
- 118 Hilgert I.:
The involvement of activated specific suppressor T-cells in maintenance of transplantation tolerance.
Immunol. Rev. 46, 27-53 (1979)
- 119 Hirschberg H., E.Thorsby:
Activation of human suppressor cells in mixed lymphocyte cultures.
Scand.J.Immunol. 6, 809-815 (1977)
- 120 Hodes R.J., K.S.Hathcock:
In vitro generation of suppressor cell activity:
Suppression of in vitro induction of cell-mediated cytotoxicity.
J.Immunol.116, 167-177 (1976)
- 121 Hopt U.T., W.Sullivan, R.Hoffman, R.L.Simmons:
Migration and cell recruiting activity of specifically sensitized lymphocytes in sponge matrix allografts.
Transplantation 30, 411-416 (1980)

- 122 Hopt U.T., H.Bockhorn, G.H.Müller, K.Thiede,
R.L. Simmons:
Lymphocyte-recruiting capacity of cells infiltrating
rejecting sponge matrix allografts in vivo.
Transplant. Proc. 15, 367-370 (1983)
- 123 Informationsschrift der Firma "Pharmacia Fine Chemicals"
Schweden:
Sephadex^R-gel filtration in theory and practice.
- 124 Jeannet M., V.W.Pinn, M.H.Flax, H.J.Winn, P.S.Russel:
Humoral antibodies in renal allotransplantation in man.
New Engl.J.Med. 282, 111-117 (1970)
- 125 Jeannet M., P.T.Klouda, C.Werner, P.Vassalli, C.Legendre,
E.Ramirez:
Antibody responses on kidney transplant recipients and
graft survival.
Transplant. Proc. 9, 747-749 (1977)
- 126 Jerrells T.R., J.H.Dean, G.R.Richardson, R.B.Herberman:
Depletion of monocytes from peripheral blood mononuclear
leucocytes: comparison of the Sephadex G 10 column method
with other commonly used techniques.
J.Immunol.Meth. 32, 11-29 (1980)
- 127 Jones B., C.A.Janeway:
Cooperative interaction of B-lymphocytes with antigen-
specific helper T-lymphocytes is MHC restricted.
Nature 292, 547-549 (1981)
- 128 Julius M.H., E.Simpson, L.A.Herzenberg:
A rapid method for the isolation of functional thymus-
derived murine lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 3, 645-646 (1973)

- 129 Julius M.H., A.A.Augustin:
Helper activity of T-cells stimulated in long-term culture.
Eur.J.Immunol. 9, 671-680 (1979)
- 130 Kapp J.A., C.W.Pierce, J.Theze, B.Benacarra:
Modulation of immune responses by suppressor T-cells.
Federation Proc. 37, 2361-2364 (1978)
- 131 Kasahara T., K.Kin, Y.Itoh, T.Kawai, M.Morita,
K.Shioiri-Nakano:
Cellular cooperation in lymphocyte-activation.
IV. Requirement of cell-to-cell interaction for the
activation of human T- and B-lymphocytes by protein A.
Cell.Immunology 49,142-153 (1980)
- 132 Kasakura S., L.Lowenstein:
The effect of irradiation in vitro on mixed leucocyte
cultures and on leucocyte cultures with phytohaemag-
glutinin.
Histocompatibility Testing, Series Haematologica 11,
Munksgaard, Copenhagen, 211-228 (1965)
- 133 Katz S.I., D.Parker, J.L.Turk:
B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions.
Nature 251, 550-551 (1974)
- 134 Kaufman D.B., C.Carnaud, J.L. Stach, J.F. Bach:
The suppressive effect of a supernate from Concanavalin
A-activated human lymphocytes: Effects of Concanavalin A-
activated lymphocytes and their supernates on cytotoxic
and mixed lymphocyte reactions.
Cell.Immunology 47, 153-162 (1979)

- 135 Kilshaw P.J., L.Bunt:
Further studies on suppressor T-cells in mice un-
responsive to H-2-incompatible skin grafts.
Transplant. Proc. 9, 717-719 (1977)
- 136 Kina T., S.Nishikawa, Y.Katsura:
T-cell regulation of pokeweed-mitogen-induced poly-
clonal immunoglobulin production in mice.
I.Characterization of helper T-cells.
Immunology 46, 575-581 (1982)
- 137 Kina T., S.Nishikawa, Y.Katsura:
T-cell regulation of pokeweed-mitogen-induced poly-
clonal immunoglobulin production in mice.
II.Mechanism of the induction of suppressor T-cells.
Immunology 46, 583-587 (1982)
- 138 Kirchner H., T.M.Chused, R.B.Herberman, H.T.Holden,
D.H.Lavrin:
Evidence of suppressor cell activity in spleens of
mice bearing primary tumors induced by moloney sarcoma
virus.
J.Exp.Med. 139, 1473-1487 (1974)
- 139 Knop J.:
Influence of various macrophage populations on Con A-
induced T-cell proliferation.
Immunology 41, 379-385 (1980)
- 140 Koller C.A., G.W.King, P.E.Hurtubise, A.L.Sagone,
A.F.LoBuglio:
Characterization of glass adherent human mononuclear
cells.
J.Immunol. 111, 1610-1612 (1973)

- 141 Kragballe K., J.Ellegaarde:
ATPase activity of purified human normal T- and B-
lymphocytes.
Scand.J.Haematol. 20, 271-279 (1978)
- 142 Kuratorium für Heimdialyse:
Entwicklung der Nierentransplantation in der
Bundesrepublik Deutschland.
Dtsch.Ärzteblatt 80, 23 (1983)
- 143 Kvarstein B.:
A methodological study of human leucocyte adhesiveness
to glass beads.
Scand.J.Clin.Lab.Invest.23, 259-270 (1969)
- 144 Lamvik J.O.:
Separation of lymphocytes from human blood.
Acta haemat. 35, 294-303 (1966)
- 145 Land W., L.A.Castro, G.Hillebrand, W.D.Illner, B.
Schneider, W.Siebert, R.Zink, E.Albert:
Immunsuppressive Basistherapie nach Nierentransplantation.
Cyclosporin A in Kombination mit kleineren Dosen von Methyl-
prednisolon, ohne Berücksichtigung von Ausschlusskriterien.
Fortschr.Med. 100, 1912-1921 (1982)
- 146 Larsson E.L., N.N.Iscoe, A.Coutinho:
Two distinct factors are required for induction of
T-cell growth.
Nature 283, 664-666 (1980)
- 147 Laughter A.H., L.Rice, J.J.Twomey:
Suppression of lymphocyte responses by monocytoid
cells does not require cell-cell contact.
Cell.Immunology 60, 440-452 (1981)

- 148 Lawrence D.A., A.Eastman, W.O.Weigle:
Murine T-cell preparations: radiosensitivity of
helper activity.
Cell.Immunology 36, 97-114 (1978)
- 149 Lenhard V., K.Resch, K.Dreikorn, E.Ritz:
Neuere Vorstellungen zu den Mechanismen der Abstoßungs-
reaktion nach Nierentransplantation.
Klin.W'schr. 56, 51-60 (1978)
- 150 Lepage V., J.C.Gluckman, J.Bedrossian, A.Duboust,
T.Nebout, C.Bracq, M.C.Rudloff, J.Dausset:
Anti-B-cell lymphocytotoxic antibodies in kidney
transplant recipients.
Transplantation 25, 255-258 (1978)
- 151 Lis H., N.Sharon:
Lectins: their chemistry and application to immunology.
III. Purification and molecular properties of lectins.
In: The Antigens Vol. 4, 436-465, ed.: Sela M., Acad.
Press, New York (1977)
- 152 Livnat S., R.B.Corley:
T-cell help in cytotoxic T-lymphocyte responses.
Role of the I region in helper cell induction.
Transplantation 35, 78-82 (1983)
- 153 Lomnitzer R., A.R.Rabson:
Mechanism of suppression of lymphocyte proliferation
by Concanavalin A-activated mononuclear cells.
Immunology 43, 475-481 (1981)
- 154 Loos J.A., D.Roos:
Ficoll-isopaque gradients for the determination of
density distributions of human blood lymphocytes
and other reticulo-endothelial cells.
Exp.Cell Res. 86, 333-341 (1974)

- 155 Lowry R.P., K.E.Gurley, R.D.C.Forbes:
Immune mechanisms in organ allograft rejection.
Transplant. Proc. 14, 679-681 (1982)
- 156 Lowry R.P., K.E.Gurley:
Immune mechanisms in organ allograft rejection.
III. Cellular and humoral immunity in rejection of
organ allografts transplanted across MHC subregion
disparity RT 1.B (RT 1.D).
Transplantation 36, 405-411 (1983)
- 157 Luciani G., M.Castagneto, C.Monari, E.Renna:
Cytotoxic antibodies to B-lymphocytes in kidney
transplant patients.
Transplant. Proc. 11, 1265-1266 (1979)
- 158 Ly I.A., R.I.Mishell:
Separation of mouse spleen cells by passage through
columns of Sephadex G-10.
J.Immunol.Meth. 5, 239-247 (1974)
- 159 Mäkelä O., T.Hautala:
Reactions of plant anti-N agglutinins with red cells
treated with proteolytic enzymes.
Ann.Med.Exp.Biol.Fenn. 36, 323-327 (1958)
- 160 Mason D.W., P.J.Morris:
Inhibition of the accumulation, in rat kidney allografts
of specific - but not nonspecific - cytotoxic cells by
cyclosporine.
Transplantation 37, 46-51 (1984)
- 161 McCluskey R.T.:
Comments on targets in rejecting allografts.
Transplant. Proc. 12, Suppl. 1, 22-25 (1980)

- 162 Medawar P.B.:
The behaviour and fate of skin autografts and skin
homografts in rabbits.
J.Anat.Lond. 78, 176-199 (1944)
- 163 Medawar P.B.:
Second study of behaviour and fate of skin homografts
in rabbits.
J.Anat.Lond. 79, 157-173 (1945)
- 164 Medawar P.B.:
The homograft reaction.
Proc.Royal Soc.B. 148, 145-157 (1958)
- 165 Mel H.C.:
Sedimentation properties of nucleated and non-
nucleated cells in normal rat bone marrow.
Nature 200, 423-425 (1963)
- 166 Merrill J.P.:
Diagnosis and management of rejection in allografted
kidneys.
Transplant. Proc. 3, 287-292 (1971)
- 167 Messmer K.:
Persönliche Mitteilung.
(1980)
- 168 Miller R.G., R.A.Phillips:
Separation of cells by velocity sedimentation.
J.Cell Physiol. 73, 191-202 (1969)
- 169 Miller R.G.:
Physical separation of lymphocytes.
In: The Lymphocyte - Structure and Function, ed.: Mar-
chalonis J.J., Dekker Inc., New York-Basel, 205-223 (1975)

- 170 Miller T.E., L.Scott, G.Simpson, D.J.Ormrod:
Depression of the T-lymphocyte response to phyto-
haemagglutinin by renal cells.
Clin.exp.Immunol 24, 492-500 (1976)
- 171 Möller E.:
Current concepts for activation of alloreactive lympho-
cytes.
Transplant. Proc. 10, 333-338 (1978)
- 172 Möller G.:
Demonstration of mouse isoantigens at the cellular
level by fluorescent technique.
J.Exp.Med. 114, 415-432 (1961)
- 173 Mohanakumar T., M.A.Giedlin, C.L. Rhodes, C.H.Du Vall,
G.Mendezpicon, A.M.Kaplan, H.M.Lee:
Relationship of B-cell alloantibodies to renal allograft
survival.
Transplantation 27, 273-278 (1979)
- 174 Monaco A.P., M.L.Wood, P.S.Russell:
Some effects of purified heterologous anti-human
lymphocyte serum in man.
Transplantation 5, 1106-1114 (1967)
- 175 Moon R., R.A.Phillips, R.G.Miller:
Sedimentation and volume analysis of human bone marrow.
Ser.Haemat. 5, 163-178 (1972)
- 176 Murphy J.B.:
Factors of resistance to heteroplastic tissue graftings.
Studies in tissue specificity. III.
J.Exp.Med. 19, 513-522 (1914)

- 177 Murray J.E., J.P.Merrill, J.H.Harrison, R.E.Wilson,
G.J.Dammin:
Prolonged survival of human kidney homografts by
immunosuppressive drug therapy.
New Engl.J.Med. 268, 1315-1323 (1963)
- 178 Najarian J.S., J.E.Foker:
Mechanisms of kidney allograft rejection.
Transplant. Proc. 1, 184-193 (1969)
- 179 Najarian J.S.:
Immunologic aspects of organ transplantation.
Hosp.Pract. 17, 61-71 (1982)
- 180 Nanra S.K., B.Boettcher:
Correlation between mixed lymphocyte culture and
phytohaemagglutinin stimulation responses of human
lymphocytes.
Clin.exp.Immunol. 41, 173-175 (1980)
- 181 Neta R., S.B.Salvin:
Specific suppression of delayed hypersensitivity.
The possible presence of a suppressor B-cell in the
regulation of delayed hypersensitivity.
J.Immunol. 133, 1716-1725 (1974)
- 182 Nicolson G.L.:
Concanavalin A: the tool, the techniques and the
problems.
In: Concanavalin A as a tool, 3-15, ed.: Bittinger H.,
John Wiley & Sons Ltd., London-New York-Sydney-Toronto
(1976)
- 183 Nishikawa S., T.Hirata, T.Izumi:
PPD-induced immunoglobulin production in human peripheral
blood lymphocytes.
II.Separation of PPD-reactive helper T-cells from

PWM-reactive helper T-cells in polyclonal immunoglobulin production of human peripheral blood lymphocytes.

J.Immunol. 123, 1106-1109 (1979)

- 184 North M.E., M.K.Brenner:

Induction of immunoglobulin and antigen-dependent antibody synthesis in human lymphocytes, using supernatants from mitogen-stimulated cultures.

Immunology 48, 157-163 (1983)

- 185 Oehler J.R., R.B.Herberman, D.A.Campbell, J.Y.Djeu:

Inhibition of rat mixed lymphocyte cultures by suppressor macrophages.

Cell.Immunol. 29, 238-250 (1977)

- 186 Opelz G., P.I.Terasaki:

Significance of mixed leucocyte culture testing in cadaver kidney transplantation.

Transplantation 23, 375-380 (1977)

- 187 Oppenheim J.J., A.Togawa, L.Chedid, S.Mizel:

Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor.

Cell.Immunol. 50, 71-81 (1980)

- 188 Parrott D.M.V., P.C.Wilkinson:

Lymphocyte locomotion and migration.

Progr.Allergy 28, 193-284 (1981)

- 189 Peavy D.L., C.W.Pierce:

Cell mediated immune response in vitro.

I.Suppression of the generation of cytotoxic lymphocytes by Concanavalin A and Concanavalin A-activated spleen cells.

J.Exp.Med. 140, 356-369 (1974)

- 190 Pedersen N.C., B.Morris:
The role of the lymphatic system in the rejection of
homografts.
A study of lymph from renal transplants.
J.Exp.Med. 131, 936-969 (1970)
- 191 Penny R., D.A.G.Galton, J.T.Scott, V.Eisen:
Studies on neutrophil function.
I.Physiological and pharmacological aspects.
Brit.J.Haemat. 12, 623-632 (1966)
- 192 Peterman G.M., L.C.Altman, L.Corey:
Human T-lymphocyte cooperation in proliferative
responses to specific antigens, mitogens and alloantigens.
J.Immunol. 126, 1547-1552 (1981)
- 193 Phanuphak P., J.W.Moorehead, H.N.Claman:
Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice.
III.Transfer of tolerance with "suppressor T-cells".
J.Immunol. 113, 1230-1236 (1974)
- 194 Pichlmayr R.:
Vortrag bei einer Informationstagung der Sandoz AG
Basel für Wissenschaftsjournalisten.
Basel, 10.Februar 1983
- 195 Pielsticker K.:
Vergleichende morphologische Untersuchungen zur
Abstoßungsreaktion in menschlichen und experimentellen
Organtransplantaten.
Habilitationsschrift München (1974)
- 196 Pierce C.W., J.A.Kapp:
Regulation of immune responses by suppressor T-cells.
Contemp.Top.Immunobiol. 5, 91-143 (1976)

- 197 Platt J.L., T.W.Lebien, A.F.Michael:
Interstitial mononuclear cell populations in renal rejection: identification by monoclonal antibodies in tissue sections.
J.Exp.Med. 155, 17-30 (1982)

- 198 Porter K.A.:
Morphological aspects of renal homograft rejection.
In: Transplantation of tissues and organs, ed.: Brent L.,
Brit.med.Bull. 21, 97-182 (1965)

- 199 Primi D., G.K.Lewis, J.W.Goodman:
Composite activities on B-cells of products released by T-cells activated by Concanavalin A.
Eur.J.Immunol. 9, 607-612 (1979)

- 200 Rabellino E., S.Colon, H.M.Grey, E.R.Unanue:
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
I.Distribution and quantitation.
J.Exp.Med. 133, 156-167 (1971)

- 201 Rabinowitz Y.:
Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations.
Blood 23 , 811-828 (1964)

- 202 Rabinowich H., C.Bahary, N.Ben-Aderet, A.Klajman:
Cellular and humoral suppressor activity induced by Concanavalin A-stimulated human fetal liver cells.
Transplantation 35, 452-457 (1983)

- 203 Raff M.C., M.Sternberg, R.B.Taylor:
Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells.
Nature 225, 553-554 (1970)

- 204 Raftery M.J., L.W.Poulter, P.Sweny, O.N.Fernando,
G.Janossy, J.F.Moorhead:
Heterogeneity of macrophage-like cells in normal kidney
and in renal allograft rejection.
Transplant. Proc. 15, 1781-1783 (1983)
- 205 Reinherz E.L., P.C.Kung, G.Goldstein, S.F.Schlossman :
A monoclonal antibody reactive with the human cytotoxic/
suppressor T-cell subset, previously defined by a
hetero antiserum termed Th-2.
J.Immunol. 124, 1301-1307 (1980)
- 206 Reinherz E.L., S.F.Schlossman:
Regulation of the immune response - inducer and suppres-
sor T-lymphocyte subsets in human beings.
New Engl.J.Med. 303, 370-373 (1980)
- 207 Rich S.S., R.R.Rich:
Regulatory mechanisms in cell-mediated immune responses.
I.Regulation of mixed lymphocyte reactions by alloanti-
gen-activated thymus-derived lymphocytes.
J.Exp.Med. 140, 1588-1603 (1974)
- 208 Rich S.S., F.M.Orson, R.R.Rich:
Regulatory mechanisms in cell-mediated immune responses.
VI.Interaction of H-2 and non-H-2 genes in the elabora-
tion of mixed leucocyte reaction suppressor factor.
J.Exp.Med. 146, 1221-1233 (1977)
- 209 Rigas D.A., E.E.Osgood:
Purification and properties of the phytohemagglutinin
of Phaseolus vulgaris.
J.Biol.Chem. 212, 607-615 (1955)
- 210 Roder J.C., K.Karre, R.Kiessling:
Natural killer cells.
Progr.Allergy 28, 66-159 (1981)

- 211 Röllinghoff M., A.Starzinski-Powitz, K.Pfizenmaier,
H.Wagner:
T-T-cell interactions during in vivo-responses to
transplantation antigens.
Transplant. Proc. 9, 695-697 (1977)
- 212 Röllinghoff M., K.Pfizenmaier, H.Wagner:
T-T-cell interactions during cytotoxic T-cell responses.
IV. Murine lymphoid dendritic cells are powerful stimu-
lators for helper T-lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 12, 337-342 (1982)
- 213 Rosenthal A.S.:
Regulation of the immune response-role of the macrophage.
New Engl.J.Med. 303, 1153-1156 (1980)
- 214 Russell P.S., H.J.Winn:
Transplantation (First of three parts).
New Engl.J.Med. 282, 786-793 (1970)
- 215 Russell W.O., S.C.Chang:
A new technique for detecting malignant cells in sputum.
Cancer 20, 681-686 (1967)
- 216 Salisbury J.G., J.M.Graham, C.A.Pasternak:
A rapid method for the separation of large and small
thymocytes from rats and mice.
J.Biochem.Biophys.Meth. 1, 341-347 (1979)
- 217 Seal S.H.:
A method for concentrating cancer cells suspended in
large quantities of fluid.
Cancer 9, 866-868 (1956)

- 218 Seki Y., K.Sakagami, H.Tkaeuchi, K.Tanaka, A.Namba, S.Fuchimoto, K.Orita:
Evidence for donor-specific cell-mediated lympholysis, unresponsiveness and suppressor-cells in well functioning kidney transplants.
Transplant. Proc. 15, 2131-2135 (1983)
- 219 Sharon N., H.Lis:
Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins.
Science 177, 949-959 (1972)
- 220 Shortman K.:
The separation of different cell classes from lymphoid organs. II.The purification and analysis of lymphocyte populations by equilibrium density gradient centrifugation.
Aus.J.Exp.Biol.Med.Sci. 46, 375-396 (1968)
- 221 Shortman K., N.Williams, H.Jackson, P.Russell, P.Byrt, E.Diener:
The separation of lymphocytes from phagocytes on glass bead columns and its effect on subpopulations of lymphocytes and antibody-forming cells.
J.Cell Biol. 48, 566-579 (1971)
- 222 Shortman K., H.v.Boehmer, J.Lipp,K.Hopper:
Subpopulations of T-lymphocytes. Physical separation, functional specialisation and differentiation pathways of thymus-dependent peripheral lymphocytes.
Transplant.Rev. 25, 163-210 (1975)
- 223 Shou L., S.A.Schwartz, R.A.Good:
Suppressor cell activity after ConA treatment of lymphocytes from normal donors.
J.Exp.Med. 143, 1100-1110 (1976)

- 224 Silvers W.K., S.T.Bartlett, H.D.Chen, H.L.Fleming,
A.Naji, C.F.Barker:
Major histocompatibility complex restriction and
transplantation immunity.
A possible solution to the allograft problem.
Transplantation 37, 28-32 (1984)
- 225 Simonsen M., J.Buemann, A.Gammeltoft, F.Jensen,
K.Jørgensen:
Biological incompatibility in kidney transplantation
in dogs.
I.Experimental and morphological investigations.
Acta Path. 32, 1-35 (1953)
- 226 Skoog W.A., W.S.Beck:
Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglu-
tinin methods of isolating leukocytes.
Blood 11, 436-454 (1956)
- 227 Smith K.A., L.B.Lachmann, J.J.Oppenheim, M.F.Favata:
The functional relationship of the interleukins.
J.Exp.Med. 151, 1551-1556 (1980)
- 228 Smith R.T., M.Norcross, V.Maino, Y.Konaka:
Helper mechanisms in T-cell activation.
Immunol.Rev. 51, 193-214 (1980)
- 229 Snow C., H.R.Hilgard:
Local cellular immunity in the draining lymph nodes
of mice after immunization with histocompatibility
alloantigens.
Transplantation 32, 29-33 (1981)
- 230 Schlossman S.F., L.Hudson:
Specific purification of lymphocyte populations on a
digestible immunoabsorbent.
J.Immunol. 110, 313-315 (1973)

- 231 Schmidtke J.R., R.M.Ferguson, M.J.Beierle, R.L.Simmons,
J.S.Najarian:
The clinical significance of pre- and posttransplant
immunologic monitoring.
Transplant. Proc.11, 350-353 (1979)
- 232 Schöne G.:
Über Transplantationsimmunität.
Münch.Med.W'schr. 9, 457-458 (1912)
- 233 Schwartz R.S., W.Dameshek:
Drug-induced immunological tolerance.
Nature 183, 1682-1683 (1959)
- 234 Standards Committee of the American Society of
Transplant Surgeons:
Current results and Expectations of renal transplantation.
J.A.M.A. 246, 1330-1331 (1981)
- 235 Starzl T.E., T.L.Marchioro, K.A.Porter, Y.Iwasaki,
G.J.Cerilli:
The use of heterologous antilymphoid agents in canine
renal and liver homotransplantation and in human renal
homotransplantation.
Surg.Gynec.Obstet. 124, 301-318 (1967)
- 236 Starzl T.E., S.Iwatsuki, D.H.v.Thiel, J.C.Gartner,
B.J.Zitelli, J.J.Malatack, R.R.Schade, B.W.Shaw,
T.R.Hakala, J.T.Rosenthal, K.A.Porter:
Evolution of liver transplantation.
Hepatology 2, 614-636 (1982)
- 237 Steinman R.M.:
Dendritic cells.
Transplantation 31, 151-155 (1981)

- 238 Steinmuller D.:
Allograft immunity produced with skin isografts
from immunologically tolerant mice.
Transplant. Proc. 1, 593-596 (1969)
- 239 Steinmuller D.:
Passenger leucocytes and the immunogenicity of
skin allografts: A critical reevaluation.
Transplant. Proc. 13, 1094-1098 (1981)
- 240 Stiller C.R., N.R.St.C. Sinclair:
Monitoring of rejection.
Transplant. Proc. 11, 343-349 (1979)
- 241 Strober S., J.L.Gowans:
The role of lymphocytes in the sensitization of rats
to renal homografts.
J.Exp.Med. 122, 347-360 (1965)
- 242 Strom T.B., N.L.Tilney, C.B.Carpenter, G.J.Busch:
Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating
renal allografts.
New Engl.J.Med. 292, 1257-1263 (1975)
- 243 Struck E., W.Land, F.Sebening:
Transplantationschirurgie.
Die gleichzeitige Entnahme von Herz und Nieren zu
Transplantationszwecken.
Bayr.Ärtzeblatt 5, 377-383 (1982)
- 244 Struck E., E.König, S.Hagl, W.Land, J.Richter, E.Albert,
H.Angstwurm, J.Billing, G.Döring, G.Feifel, J.Gokel, W.Göss-
ner, C.Hammer, U.Klein, H.Meisner, R.Meyendorf, P.Schmidt-
Habelmann, B.Seling, F.Sebening:
Herztransplantation: erfolgreiche Behandlung post-
operativer Komplikationen.
Herz 7, 406-423 (1982)

- 245 Stuart F.P., E.Bastien, A.Holter, F.W.Fitch,
W.L.Elkins:
Role of passenger leucocytes in the rejection of
renal allografts.
Transplant. Proc. 3, 461-464 (1971)
- 246 Thomas F., G.Mendez-Pico, J.Thomas, H.M.Lee:
Quantitation of pretransplantation and immune respon-
siveness by in vitro T-cell testing.
Transplant. Proc. 9, 49-53 (1977)
- 247 Thomas Y., J.Sosman, O.Irigoyen, S.M.Friedman, C.Kung,
G.Goldstein, L.Chess:
Functional analysis of human T-cell subsets defined
by monoclonal antibodies.
I.Collaborative T-T interactions in the immunoregulation
of B-cell differentiation.
J.Immunol. 125, 2402-2408 (1980)
- 248 Thorsby E.:
Present state of histocompatibility typing and matching
in renal transplantation: an introduction.
Transplant. Proc. 14, 173-177 (1982)
- 249 Tilney N.L., M.R.Garovoy, G.J.Busch, T.B.Strom, M.J.
Gravse, C.B.Carpenter:
Rejected human renal allografts. Recovery and charac-
teristics of infiltrating cells and antibody.
Transplantation 28, 421-426 (1979)
- 250 Truitt G.A., R.R.Rich, S.S.Rich:
Regulation of cytotoxic lymphocyte responses in vitro
by alloantigen-activated spleen cells.
J.Immunol. 119, 31-37 (1977)

- 251 Tse H.Y., R.W.Dutton:
Separation of helper and suppressor-T-lymphocytes.
III.Positive and negative effects of mixed lymphocyte
reaction-activated-T-cells.
J.Immunol. 120, 1149-1152 (1978)
- 252 Tse H.Y., R.H.Schwartz, W.E.Paul:
Cell-cell interactions in the T-cell proliferative
response.
I.Analysis of the cell types involved and evidence
for nonspecific T-cell recruitment.
J.Immunol. 125, 491-500 (1980)
- 253 Ullmann E.:
Experimentelle Nierentransplantation.
Wien.klin.W'schr. 15, 281-282 (1902)
- 254 Ulmer A.J., H.D.Flad:
Discontinuous density gradient separation of human
mononuclear leucocytes using Percoll^R as gradient
medium.
J.Immunol.Meth. 30, 1-10 (1979)
- 255 Wagner H., M.Feldmann, W.Boyle, J.W.Schrader:
Cell-mediated immune response in vitro.
III.The requirement for macrophages in cytotoxic
reactions against cell-bound and subcellular alloantigens.
J.Exp.Med. 136, 331-343 (1972)
- 256 Wagner H., M.Röllinghoff, G.J.V.Nossal:
T-cell-mediated immune responses induced in vitro:
A probe for allograft and tumor immunity.
Transplant. Rev. 17, 3-36 (1973)
- 257 Wagner H., C.Hardt, K.Heeg, K.Pfizenmaier, H.Stötter,
M.Röllinghoff:
The in vivo effects of Interleukin 2 (TCGF).
Immunobiol. 161, 139-156 (1982)

- 258 Walker R.I., J.C.Herion, J.G.Palmer:
Leucocyte labeling with inorganic radiophosphorus.
Am.J.Physiol. 201, 1137-1141 (1961)
- 259 Wecker E., A.Schimpl:
Mediatorstoffe als Kommunikationsmittel von Lymphozyten
bei der Immunreaktion.
Klin.W'schr. 57, 631-640 (1979)
- 260 Weksler M.E., M.M.Kuntz, G.Birnbaum, J.B.Innes:
Lymphocyte transformation induced by autologous cells.
Fed.Proc. 37, 2370-2373 (1978)
- 261 Wembacher J., I.Senftleber, J.Gokel, C.Hammer, W.Brendel:
Charakterisierung von lymphatischen Zellen aus natürlichen
und künstlichen Alлотransplantaten.
Chir.Forum Exp.Klin.Forsch. 115-119 (1980)
- 262 Whisler R., Y.Newhouse:
Cellular characteristics and specificity of alloactivated
regulatory T-cells modulating T-cell-mediated responses.
Cell.Immunol. 60, 393-402 (1981)
- 263 Widder K.J., A.E.Senyei, H.Ovadia, P.Y.Paterson:
Magnetic protein A microspheres: a rapid method for
cell separation.
Clin.Immunol.Immunopathol. 14, 395-400 (1979)
- 264 Wigzell H., B.Andersson:
Cell separation on antigen-coated columns.
Elimination of high rate antibody-forming cells and
immunological memory cells.
J.Exp.Med. 129, 23-36 (1969)

- 265 Wigzell H., P.Golstein, E.A.J.Svedmyr, M.Jondahl:
Impact of fractionation procedures on lymphocyte
activities in vitro and in vivo.
Separation of cells with high concentrations of
surface immunoglobulin.
Transplant. Proc. 4, 311-319 (1972)
- 266 Willebrand von E., P.Häyry:
Composition and in vitro cytotoxicity of cellular
infiltrates in rejecting human kidney allografts.
Cell.Immunol. 41, 358-372 (1978)
- 267 Williams G.M., A.ter Haar, L.C.Parks, C.A.Krajewski:
Endothelial changes associated with hyperacute, acute
and chronic renal allograft rejection in man.
Transplant. Proc. 5, 819-822 (1973)
- 268 Wood P.J., J.W.Streilein:
Immunogenetic basis of acquired transplantation
tolerance.
Transplantation 37, 223-226 (1984)
- 269 Wottge H.U., J.M.Jensen, W.Müller-Ruchholtz:
Increase of MLC-sensitivity by elimination of a non-
adherent responder cell subpopulation with anti-macro-
phage serum.
J.Immunol. Meth. 61, 151-156 (1983)
- 270 Wozniak J.T., T.L.Orchard, P.H.Mackie, D.K.Mistry,
J.Stuart:
Lysosomal enzyme cytochemistry of blood neutrophils.
J.Clin.Pathol. 31, 648-653 (1978)
- 271 Yokoyama K., O.Yano, T.Terao, T.Osawa:
Purification and biological activities of pokeweed
(*Phytolacca americana*) mitogens.
Biochem.Biophys.Acta 427, 443-453 (1976)

- 272 Zucker R.M., D.M.Helfman:
Thymus subpopulations: density gradients and volume
distributions studies.
Cell.Immunol. 22, 43-52 (1976)
- 273 Zukoski C.F., J.M.Callaway, W.G.Rhea:
Prolonged acceptance of a canine renal allograft
achieved with prednisolone.
Transplantation 3, 380-386 (1965)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Brendel danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für chirurgische Forschung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Einführung in die immunologischen Grundlagen der Transplantation und für die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen im Verlaufe der Arbeit.

Herrn Dr. med. J. Wembacher danke ich für die unermüdliche chirurgische Unterstützung bei den Transplantationen und für einen stets fruchtbaren Gedankenaustausch.

Für die technische Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich ganz besonders Fräulein A. Allmeling, G. Höbel, H. Beyer und L. Doischer danken.

Herrn Prof. Dr. Gokel vom Pathologischen Institut der Universität München danke ich für die Beurteilung der histologischen Präparate.

Herrn O. Frisch gilt mein Dank für die zuverlässige Hilfe bei der Pflege der nierentransplantierten Tiere.

Fräulein C. Scheid danke ich für die große Geduld, die sie während der Ausarbeitung der Arbeit aufbrachte.

Lebenslauf

- 02.04.1955 geboren in Marbach/Neckar als Sohn des Studiendirektors Kurt Senftleber und seiner Ehefrau Ilse, geb. Bolch.
- 1962 - 1966 Besuch der Volksschule in Freiberg/N.
- 1966 - 1968 Schiller-Gymnasium in Ludwigsburg
- 1968 - 1974 Besuch des Knabeninstitutes in Wilhelmsdorf, Reifeprüfung im Juni 1974
- 10.74 - 04.75 Bundeswehr (Bundeswehr-Krankenhaus Ulm)
- 05.75 - 10.82 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
Praktisches Jahr in Innerer Medizin (Großhadern), Chirurgie (München-Schwabing) und Urologie (Großhadern)
- Ende 1978 Beginn der Mitarbeit am Institut für Chirurgische Forschung
- 11.1983 Approbation als Arzt

Bis November 1983 war ich am Bundeswehrkrankenhaus München auf den Abteilungen Orthopädie, Innere Medizin und Chirurgie tätig.

